

TRANSFER RNA^{TYR} GENE VON
DROSOPHILA MELANOGASTER:
STADIENSPEZIFISCHE EXPRESSION
UND
FUNKTION DER INTRONS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
BEAT SUTER
aus Winterthur ZH und Unterehrendingen AG

Begutachtet von Herrn
Prof. Dr. E. Kubli

Zürich 1987

TRANSFER RNA^{TYR} GENE VON
DROSOPHILA MELANOGASTER:
STADIENSPEZIFISCHE EXPRESSION
UND
FUNKTION DER INTRONS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der

UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

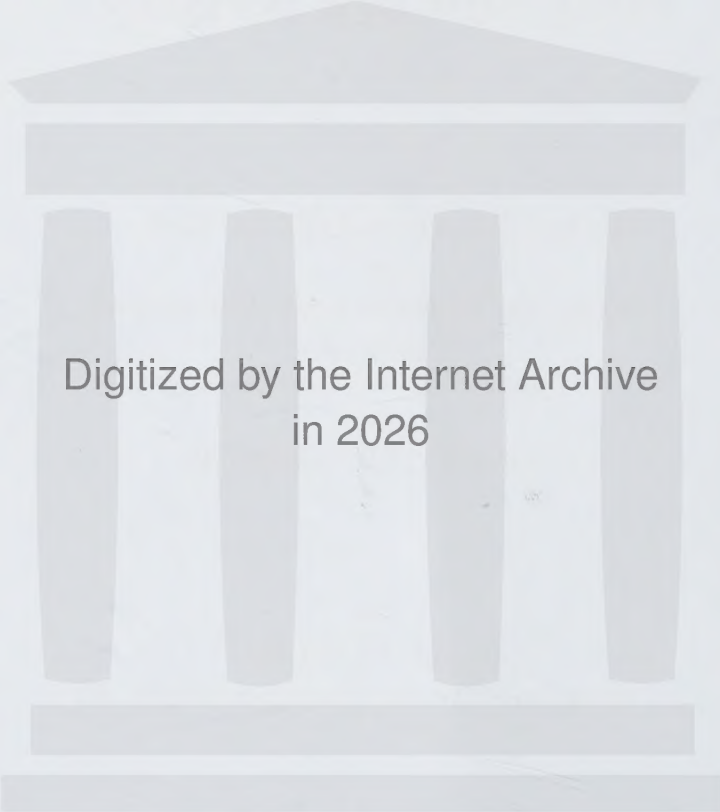
BEAT SUTER

aus Winterthur ZH und Unterehrendingen AG

Begutachtet von Herrn

Prof. Dr. E. Kubli

Zürich 1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507223_0031

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Zusammenfassung	i
Abkürzungen	iii
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	3
1. Versuchstiere	3
2. RNA Isolationen	
a) Transfer-RNA	3
b) Kern-RNA	3
c) Poly(A)*-RNA	4
3. Transfer-RNA Sequenziermethoden	4
a) Verdauung und <i>in vitro</i> Markierung	4
b) Sequenziergele	5
c) Enzymatische Totalverdauungen	6
d) Basenanalysen	6
e) <i>in vivo</i> Markierungen	6
4. DNA Isolationen	6
a) λ Minipräparation	6
b) λ Maxipräparation	8
c) Plasmidenminipräparation	8
d) Plasmidenmaxipräparation	9
5. M13 Techniken	9
a) Wirtsbakterien	9
b) Vektoren	9
c) Nährmedien	9
d) Transformationen	9
e) Präparation von einzelsträngiger DNA	10
f) Präparation von doppelsträngiger DNA	11
g) Nukleotidlösungen	12
h) Gelelektrophorese	14
i) Oligonukleotide	16
j) DNA Sequenzieren	17
k) M13 Proben	19
l) Test auf komplementäre DNA Stränge	20
6. Screenen der λ Bank	20
7. S ₁ -Mapping	24
8. Primer Extension	26
9. <i>in situ</i> Hybridisierung	27
10. übrige Techniken	27

III. Resultate	28
1. Transfer-RNA ^{Tyr} Sequenzanalyse	28
2. Isolation und Struktur der tRNA ^{Tyr} Gene von <i>Drosophila</i>	30
3. Funktion von Introns in tRNA ^{Tyr} Genen	50
4. Expression der tRNA ^{Tyr} Gene in <i>Drosophila</i>	59
-Nachweis der Expression der tRNA ^{Tyr} Gene Y28C und Y22Fb	60
-Stadienspezifische Expression	64
-Transfer RNA ^{Tyr} Gen Y28C	64
-Transfer RNA ^{Tyr} Gen Y22Fb	65
5. Polyadenylierte Transkripte in den tRNA ^{Tyr} Regionen	66
-Polyadenylierte Transkripte der Region 28C	67
-Polyadenylierte Transkripte der Region 85Aabc	70
-Polyadenylierte Transkripte der Region 85Ade	71
IV. Diskussion	76
1. Transfer RNA ^{Tyr}	76
2. Expression der tRNA ^{Tyr} Gene: Struktur der Vorläufer, Reifung der tRNA ^{Tyr} und Ψ -Modifikation	81
a) Intronsequenzen	81
b) Introntypen und Anordnung der verschiedenen tRNA ^{Tyr} Gene im Genom	82
c) Expression der tRNA ^{Tyr} Gene	83
d) Ψ -Modifikation und Sekundärstruktur	84
3. Stadienspezifische Expression der tRNA ^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C	87
4. Expression benachbarter Pol II-Gene	88
V. Literatur	93

Z U S A M M E N F A S S U N G

- Die beiden Hauptisozeptoren von tRNA^{Tyr} wurden je aus Wildtyp und *su(s)²* Fliegen von *Drosophila melanogaster* isoliert und sequenziert.
- Der mit der angewandten Methodik gefundene Unterschied beschränkt sich auf die Wobble Base in Position 34 des Anticodons. Die Anticodonsequenz der beiden tRNA^{Tyr} Hauptisozeptoren lautet: GΨA und QΨA.
- Acht tRNA^{Tyr} Gene aus den cytologischen Regionen 22F, 28C und 85A wurden isoliert und sequenziert.
- Alle acht tRNA^{Tyr} Gene enthalten ein Intron verschiedener Sequenz und Länge. Sechs Gene enthalten ein Intron von 20 bzw. 21 bp, ein Gen ein Intron von 48 bp und ein weiteres ein Intron von 113 bp.
- Die *Xenopus laevis* Ψ-Synthase erkennt alle Intronlängen und Sequenzen. Wird das Intron jedoch aus dem tRNA^{Tyr} Gen entfernt, so entsteht kein Ψ in der Mitte des tRNA Anticodons.
- Durch S₁-Mapping konnte eine stadienspezifische Expression der tRNA^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C nachgewiesen werden.
- Die Expression von Polymerase II-Genen, die in der Nähe der tRNA^{Tyr} Gene lokalisiert sind, wurde untersucht.
- Die tRNA^{Tyr} Gene der Region 22F befinden sich in der genetisch definierten Kontrollregion des DPP-Komplexes. Die Expression des Gens Y22Fb ist komplementär zu derjenigen des DPP-C-Transkripts.

- Das tRNA^{Tyr} Gen der Region 28C befindet sich entweder in der 5' flankierenden Region eines Polymerase II-Gens oder im Pol II-Gen selbst. Die Expression der beiden Gene ist stadienspezifisch reguliert und verläuft parallel.
- Die drei tRNA^{Tyr} Gene der Region 85A befinden sich unmittelbar in der 5' flankierenden Region eines Polymerase II-Gens.

A B K Ü R Z U N G E N

acp ³ U	3-(3-Amino-3-carboxypropyl)Uridin
B-Box	3'ICR, 3' interne Kontrollregion von Pol III-Genen (Promotor)
bp	Basenpaar(e)
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
D	Dihydro-Uridin
DPP-C	<i>decapentaplegic</i> Komplex
i ⁶ A	N ⁶ -Isopentenyl-Adenosin
kb	Kilobasen(paare)
manQ	β -D-Manosyl-Queuosin
m ¹ A	1-Methyl-Adenosin
m ⁵ C	5-Methyl-Cytidin
m ¹ G	1-Methyl-Guanosin
m ² G	N ² -Methyl-Guanosin
m ^{2,2} G	N ² ,N ² -Dimethyl-Guanosin
m ⁷ G	7-Methyl-Guanosin
nt	Nukleotide
Pol II	Polymerase II
Pol III	Polymerase III
Q	Queuosin
ry	<i>rosy</i>
su(s) ²	<i>suppressor of sable</i>
T/rT	Ribo-Thymidin (in RNA)
TMV	Tabak Mosaik Virus
TyrC	geclustertes tRNA ^{Tyr} Gen von <i>Xenopus laevis</i>
TyrD	dispersed tRNA ^{Tyr} Gen von <i>Xenopus laevis</i>
U ^m	2'-O-Methyl-Uridin
Y	Tyrosin, tRNA ^{Tyr} Gen
Y22Fa	tRNA ^{Tyr} Gen/Klon aus dem Locus 22F, Gen a
Y22Fb	tRNA ^{Tyr} Gen/Klon aus dem Locus 22F, Gen b
Y28C	tRNA ^{Tyr} Gen/Klon aus dem Locus 28C
Y85Aabc	tRNA ^{Tyr} Gene/Klon aus dem Locus 85A, Gene a, b c
Y85Ade	tRNA ^{Tyr} Gene/Klon aus dem Locus 85A, Gene d, e
Ψ	Pseudo-Uridin
Δ I	Gen ohne Intron
3'ICR	B-Box, 3' interne Kontrollregion von Pol III-Genen (Promotor)

I. EINLEITUNG

In allen Organismen spielt die tRNA bei der Übertragung der Nukleinsäuresprache in die Aminosäuresprache der Proteine eine zentrale Rolle. In den letzten Jahren ist jedoch, vor allem durch Untersuchungen an Prokaryonten, offensichtlich geworden, dass tRNA und tRNA Gene auch regulatorische Funktionen ausüben können, die nicht direkt mit der Proteinsynthese zu tun haben. Entsprechende Befunde sind für höhere Organismen erst spärlich vorhanden. Als Beispiel sei die Rolle einer tRNA^{Glu} bei der Chlorophyll Biosynthese erwähnt (Schön et al., 1986). Ein wichtiger Schritt bei der Aufklärung nicht Proteinsynthese gebundener Funktionen von tRNA und der sie codierenden Gene, ist das Studium der stadien- und gewebespezifischen Expression von tRNA Genen. Bei höheren Eukaryonten ist darüber wenig bekannt. Ein bestimmtes tRNA^{Ala} Gen wird nur im hinteren Teil der Seidendrüsen von *Bombyx mori* transkribiert (Sprague et al., 1977; Meza et al., 1977). In der *Xenopus laevis* Oocyte sind tRNA^{Tyr} Gene aktiv, die sich in ihrer Sequenz von den im somatischen Gewebe exprimierten unterscheiden (Gouilloud and Clarkson, 1986; S. Clarkson, pers. Mitteilung). Bei *Drosophila melanogaster* war bisher nichts bekannt über differentielle Expression von tRNA Genen (Sharp et al., 1985). *Drosophila* ist neben *Caenorhabditis* der genetisch und molekularbiologisch am besten analysierte höhere Eukaryont (A. Wilkins, 1986). Die Arbeit mit *Drosophila* bietet viele experimentelle Vorteile, zum Beispiel *in situ* Hybridisierungstechnik und Transformation (Pardue and Gall, 1975; Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982). *Drosophila melanogaster* ist daher ein geeignetes System, um Stadienspezifität, und im allgemeinen Funktionen von tRNA und tRNA Genen, *in vivo* studieren zu können. Voraussetzung dazu ist aber, dass ein tRNA Gen verwendet werden kann, dessen Expression sich verfolgen lässt. Dazu würden sich tRNA abhängige nonsense Suppressoren eignen. Trotz intensiver Suche bei genetisch charakterisierten *Drosophila melanogaster* Suppressorstämmen konnten bis jetzt keine identifiziert werden (M. Bienz, 1981; B. Suter, 1982; B. Dauwalder, 1984).

Die Techniken der gezielten Mutagenese (Zoller and Smith, 1984) und Transformation (Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982) eröffnen neue Wege. Dass tRNA Gene bei Eukaryonten zu *in vivo* funktionsfähigen nonsense Suppressoren mutiert werden können, wurde für Hefe und *Caenorhabditis* gezeigt (Celis and Piper, 1982; J. Hodgkin, 1985). Ein tRNA^{Tyr} Gen von *Xenopus laevis*, *in vitro* zu einem amber und ochre Suppressor tRNA Gen mutiert, wird in Zellkulturen exprimiert und führt zu einer funktionellen Suppressor tRNA (Laski et al., 1982; Laski et al., 1984). In Zusammenarbeit mit M. Hoffman und W. Gelbart (Harvard University), konnten im *decapentaplegic* Komplex (DPP-C; Spencer et al., 1982) von *Drosophila* zwei tRNA^{Tyr} Gene nachgewiesen werden. Eines dieser beiden tRNA^{Tyr} Gene wurde zu einem amber und einem ochre nonsense Suppressor mutiert, in Fliegen zurücktransformiert und auf Aktivität getestet. Mindestens das amber Suppressor tRNA Gen ist aktiv, es supprimiert eine *rosy* und eine CAT-amber nonsense Mutante. Gleichzeitig führt dieser Suppressor aber zu Sterilität (R. Dörig, 1986; Laski and Rubin, 1986). Somit eignet sich dieses tRNA^{Tyr} Gen nicht für das Studium von stadien- und gewebespezifischer Expression von tRNA Genen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass dieses Problem umgangen werden kann. Aufgrund verschiedener Introngrößen können bestimmte tRNA^{Tyr} Gene individuell in ihrer Expression verfolgt werden.

Durch *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die tRNA Gene von *Drosophila melanogaster* zum Teil in Clustern über das Genom verteilt sind (E. Kubli, 1987). Die Anordnung der tRNA^{Tyr} Gene ist besonders interessant (Dudler et al., 1981). Einerseits sind nie andere tRNA Species mit den tRNA^{Tyr} Genen im gleichen Cluster assoziiert, andererseits findet man die am stärksten hybridisierenden Stellen in Regionen des Genoms, die entwicklungsbiologisch interessant sind (22F: decapentaplegic-Komplex; 85A: hunchback-Region). Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, die tRNA^{Tyr} Gene dieser Regionen zu untersuchen, um mögliche kausale Interaktionen zwischen diesen, von Polymerase III transkribierten Genen, und den vorhin erwähnten Genkomplexen aufzuklären. Ein erster Schritt dazu, die Klonierung und Charakterisierung der tRNA^{Tyr} Gene, sowie das Studium der Expression benachbarter Polymerase II-Gene, wird in dieser Arbeit beschrieben.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Drosophila melanogaster Oregon R und Canton S Fliegen wurden auf Standardfutter bei 25°C gehalten.

Das Sammeln der Embryonen erfolgte wie bei W. Brunner (1982) beschrieben.

Oregon R Fliegen dienten zur Isolation von Köpfen, Extremitäten und Rumpfen. Dazu mussten die Fliegen bei -20°C kräftig geschüttelt und anschliessend durch ein Netz (Polymen PES-800/55) gesiebt werden. Zurück bleiben die Rumpfe. Auf einem feinmaschigeren Netz mit einem Öffnungsdurchmesser von 650 - 700 µm bleiben die Köpfe zurück, die Extremitäten fallen durch. Jeder Fraktionierungsschritt wurde wiederholt.

2. RNA Isolationen

a) Transfer-RNA

Die RNA Extraktion und die Isolation des G- und Q- Isoakzeptors von tRNA^{Try} erfolgte wie bei B. Suter (1982) beschrieben. Eine zweite Fraktionierung auf einer RPC-5 Säule mit den Puffern von Dunn et al. (1978) diente z.T. der weiteren Reinigung der tRNA^{Try}. Transfer-RNA Proben, die nach zweidimensionaler Gelelektrophorese noch verunreinigt waren, wurden auf einem 15% Sequenziergel weiter gereinigt.

b) Kern RNA

Die Isolation der Kerne und die Extraktion der Kern RNA ist bei H.P. Saluz (1984) im Detail beschrieben, wobei für die Kernisolation der folgende Puffer verwendet wurde (Wittig and Wittig, 1978):

- 1 M Saccharose
- 15 mM Tris-HCl pH 8
- 2,5 mM EDTA
- 0,5 mM EGTA
- 0,15 mM Spermin
- 0,5 mM Spermidin

Die Lyse der Kerne erfolgte in 80°C heissem Phenol-Homogenisationspuffer-Gemisch. Die wässrige Phase wurde mit Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) nachextrahiert. Proben, die bei der letzten Extraktion noch eine Interphase aufwiesen, wurden nochmals extrahiert. Nach wiederholter Etherextraktion und einer Ethanol-fällung wurde die RNA in H₂O gelöst. Ein Teil dieser Proben wurde weiter mit DNase I verdaut. Mit einer Macaloidbehandlung wurde die DNase von kontaminierender RNase gereinigt. Dazu wurde die Methode von Picard und Schaffner (1983) im Detail befolgt:

- 0,5 g Macaloid (ein Geschenk von M. Billeter, Zürich) in
- 50 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,6
- 5' kochen unter konstantem Rühren.
- 5' bei 4000rpm (2500g, HS4-Rotor) bei Raumtemperatur zentrifugieren. Überstand abgiessen und Macaloid in

- 10 ml Tris-Puffer vollständig suspendieren. Abzentrifugieren und resuspendieren.
 2x wiederholen. Die vierte Zentrifugation erfolgt während
 15' bei 5000rpm, und das Macaloid wird in
 30 ml Tris-Puffer suspendiert.

In dieser Form bleibt es bei 4°C haltbar.

DNase Verdünnungspuffer:

20	mM	Tris-HCL	pH 7,6
50	mM	NaCl	
1	mM	DTT	
50	% (v/v)	Glycerol	
100	µg/ml	BSA	

- 100 mg Dnase I (Worthington 2139 DP) in
 5 ml Verdünnungspuffer bei 4°C sanft lösen
 2 ml davon in verschliessbares Polyethylen RG transferieren und
 6 ml eiskaltes Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 und
 2,8 ml frisch aufgeschlämmte Macaloid Suspension zugeben. Auf
 rotierendem Rad mit 30rpm während 30' bei 4°C mischen.
 10' bei 8000rpm im SS 34 Rotor abzentrifugieren. Überstand in
 neues Polyethylen RG transferieren, mit
 2,8 ml Macaloid Suspension versetzen und erneut
 30' bei 4°C mischen. Anschliessend
 15' bei 10'000rpm abzentrifugieren, Überstand macaloidfrei
 abpipettieren und mit
 1 Vol. autoklaviertem, wasserfreiem Glycerin mischen, bei -20°C
 lagern.

Während dieser Aufbereitung sinkt die Enzymaktivität etwa auf die Hälfte.

Ein Aliquot der Kern RNA Proben wurde mit derart aufbereiteter DNase in 40µl Totalvolumen wie folgt verdaut:

20	mM	Tris-HCl	pH 7,6
50	mM	NaCl	
1	mM	DTT	
10	mM	MgCl ₂	
5	mM	CaCl ₂	
2-5	µl	DNase	

Inkubation 30' bei 37°C

Anschliessend wurden die Proben zuerst mit Phenol/Chloroform (1:1), dann 4x mit Ether extrahiert, ausgefällt und in H₂O aufgenommen.

c) Poly(A)⁺-RNA

Poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Stadien wurde aufbereitet wie bei R. Dörig (1986) beschrieben, ausser dass keine G-50 Säule verwendet wurde.

3. Transfer-RNA Sequenziermethoden

a) Verdauung und *in vitro* Markierung

- i) Der grösste Teil der Sequenz konnte nach dem Prinzip von Stanley und Vassilenko (1978) erstellt werden, wobei für die partielle Verdauung von 0,5 bis 1,5µg tRNA die folgenden Bedingungen gewählt wurden:
- Wasserverdauung 3'-9' in 10 µl bei 80°C-90°C
 - Formamidverdauung 5' in 10 µl bei 95°C

- Formamid-Barbital Verdauung 3'-6' in 10 μ l bei 90°C-95°C
 - (70 % Formamid
 - 20 mM NaCl
 - 20 mM Barbitursäure)
 und anschliessend Ethanol-fällung mit 1 ml Ethanol
- partielle Verdauung mit RNase T₂ nach Silberklang et al. (1979). 15' bei 55°C und 5' bei 60°C in 5 μ l
 - 16 mM NaCitrat, pH 5
 - 5,6 M Urea
 - 1,6 mM EDTA
 - 8 μ g/ml BSA
 - 10⁻³ U RNase T₂

Darauf folgte eine Phenolextraktion und eine Ethanol-fällung.

Die kinasierten tRNA Fragmente wurden mittels Sequenziergel aufgetrennt. Die RNA wurde aus den Gelbänden eluiert, mit 10 μ g *E. coli* tRNA ausgefällt und mit 2,5 μ g Nuklease P₁ (Sigma) einige Stunden in 50 mM NH₄-Acetat pH 5,4 verdaut (Silberklang et al., 1979).

ii) Die Methode der partiellen Verdauung mit Nuklease S₁ (Suter et al., 1986; ausführlich beschrieben bei Suter, 1982) und Markierung mit 5'-[³²P]-pCp (siehe nächster Abschnitt), diente zur Sequenzierung des Anticodons und als Ausgangsmaterial für die chemische Sequenzierung.

iii) 3' Endmarkierung von intakter tRNA mit 5'-[³²P]-pCp erfolgte wie beschrieben bei Bruce and Uhlenbeck (1978), wobei mit 15% DMSO, 20 μ g/ml Gelatine und 200-300 U/ μ l T₄-RNA Ligase (PL-Biochemicals) gearbeitet wurde. Die markierte tRNA wurde anschliessend auf einem 15% 8 M Harnstoff Sequenziergel gereinigt.

iiii) Mit der direkten chemischen Sequenziermethode von Peattie (1979, und 1983; siehe auch Saluz, 1984) konnte die Basissequenz bestimmt werden, wobei als Ausgangsmaterial einerseits ganze tRNA und andererseits Nuklease S₁ verdaute 5' tRNA Fragmente mit 5'-[³²P]-pCp markiert wurden.

b) Sequenziergele

Routinemässig erfolgten die Auftrennungen auf 8 M Harnstoff Sequenziergelen (Maxam and Gilbert, 1977) mit einer Acrylamidkonzentration von 12%, 15% oder 20% und einer Länge von 40cm oder 100cm. Mit einem Formamidgel (12% Acrylamid) nach Brownlee and Cartwright (1977) liessen sich Sekundärstrukturprobleme lösen. Ein Formamid Sequenziergel von 100 x 20 x 0,1 cm wird wie folgt hergestellt:

- 24 g Acrylamid
- 1 g Bisacrylamid in
- 140 ml deionisiertem Formamid und
- 20 ml 10x Sequenzierpuffer lösen und mit deionisiertem Formamid auf
- 200 ml auffüllen, filtrieren (nicht entgasen)
- 400 μ l TEMED
- 700 μ l 20% APS

c) Enzymatische Totalverdauungen mit RNase T₁, RNase T₂, RNase U₂ und RNase A, sowie 5'-Endmarkierungen erfolgten nach den Angaben von Silberklang et al. (1979).

d) Basenanalysen

Zur Identifikation von Nukleotid-5'-Phosphaten diente das Dünnschicht Chromatographiesystem von Silberklang et al. (1979), wobei n-Propanol meist durch tertiäres Butanol ersetzt wurde und die Auftrennung auf Cel 300 DEAE-Dünnschichtplatten erfolgte (Macherey-Nagel & Co.). Als Ergänzung fand auch das System von Nishimura (1979) Anwendung. Nukleotid-3'-Phosphat wurden aufgetrennt wie bei Nishimura (1979) beschrieben.

e) in vivo Markierungen erfolgten wie bei Saluz et al. (1983). beschrieben

4. DNA Isolationen

a) Minipräparation (im Wesentlichen nach J. Sulston, pers. Mitteilung) dienten zur Aufarbeitung von rekombinanten EMBL4 Phagen.

Wirtsbakterien:

Q358

Lösungen: NZCYM: 10 g NZ amin (Typ-A Hydrolysat, Humko)
 5 g NaCl
 1 g Casein Hydrolysat (fakultativ)
 5 g Bacto-yeast Extrakt
 2 g MgSO₄ x 7H₂O
 mit NaOH pH auf 7,5 einstellen und auf einen Liter auffüllen.
 Für Platten
 15 g/l Bactoagar,
 für Top Agar
 7 g/l Agarose verwenden.

SM: 5,8 g NaCl
 2 g MgSO₄ x 7H₂O
 50 ml 1M Tris-HCl pH 7,5
 5 ml 2% Gelatine
 mit H₂O auf einen Liter auffüllen und aliquotiert autoklavieren.

PEG/NaCl: 145 g NaCl
 200 g PEG 6000
 800 ml H₂O

Maltose: 20 % sterilfiltriert

TE: 10 mM Tris pH 8
 0,2 mM EDTA pH 8

TEE: 10 mM Tris pH 8
 10 mM EDTA pH 8

- 1 M Tris pH 7,4 autoklaviert
- 1 M MgSO_4 autoklaviert
- 10 mM MgSO_4 autoklaviert
- 20 mg/ml DNase
- 20 mg/ml RNase

Eine Übernachtskultur von Q_{358} in 50ml NZCYM/0,5ml Maltose

- 10' bei ca. 4000rpm in der Tischzentrifuge oder im HS-4 Rotor abzentrifugieren und in
- 4 ml 10 mM MgSO_4 aufnehmen.
- 10 μl einer serialen Verdünnung von λ Phagen in SM und
- 15-20 μl Q_{358}
- 20' bei 37°C inkubieren (ohne zu schütteln) und mit
- 500 μl Top Agarose auf einen Teil der Platte ausgießen. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert. Neue Übernachtskultur von Q_{358} ansetzen.
- 300 μl der Übernachtskultur und
- 30 ml SM mischen, in
- 1 ml Aliquots aufteilen und mit 1 λ -Plaque oder mit 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} μl λ Phagenstock versetzen.
- 20' 37°C schütteln.
- In der Zwischenzeit Nährmedium vorbereiten:
 - 200 ml NZCYM
 - 6 ml 1M Tris pH 7,4
 - 0,6 ml 1M MgSO_4
- 12 ml Nährmedium dazugeben und schütteln bis zur Lyse (9-11h). Dann mit
- 0,5 ml CHCl_3 0-2h weiterschütteln und mind.
- 30' bei 4°C stehen lassen.
- 1-2 ml als Lysatstock in vorbereitetes 2ml Gefäß pipettieren und bei 4°C aufbewahren. Den Rest in ein 10ml RG gießen und mit 10'000rpm (SS 34) bei 4°C abzentrifugieren. Überstand in vorbereitetem 50ml RG mit je
- 10' 5 μl DNase und RNase mind.
- 60' bei 37°C inkubieren.
- 10 ml PEG/NaCl dazugeben und mind.
- 30' bei 4°C ausfällen.
- 10' bei max. 3000rpm und 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugieren. RG auf Linsoft austropfen lassen und Überstand von der Wand entfernen. Phagen in
- 250 μl TEE aufnehmen und in Eppendorf Reaktionsgefäß transferieren.
- 300 μl Phenol dazugeben und während
- 5'-10' wiederholt schütteln.
- 15'' zentrifugieren, Überstand transferieren und nochmals Phenol extrahieren wie beschrieben. Überstand mit Ethanol ausfällen.
- 2' zentrifugieren und Überstand vollständig absaugen. DNA in
- 250 μl TE sanft (bei 4°C, während mind. 30') lösen lassen und mit

- 500 μ l EtOH/NaCl (15 ml Ethanol / 20 μ l 5M NaCl) mischen. Nach Zentrifugation Überstand vollständig absaugen, Niederschlag sanft trocknen und in 20 μ l TE aufnehmen.

b) λ Maxipräparation (nach Maniatis et al., 1982)
wurde zur Vermehrung der Charon Phagen durchgeführt.

Wirtsbakterien: LE392

Lösungen: siehe unter λ Minipräparation

Die Reinigung der λ -DNA erfolgte mit Hilfe eines Glycerin Stufen Gradienten (Vande Woude et al., 1979; ausführlich beschrieben bei Maniatis et al., 1982).

c) Plasmiden Minipräparation (H. Pelham, 1985)

Lösungen: 2TY-amp: pro Liter
10 g Bacto Trypton
10 g Bacto-yeast Extrakt
5 g NaCl
pH 7,5 mit NaOH einstellen und autoklavieren,
pro ml 6 μ l Ampicillin (25mg/ml) unmittelbar vor Gebrauch zugeben.

pro 50ml

GTE:	50 mM Glucose	1,25 ml	2M
	25 mM Tris-HCl pH 8	1,25 ml	1M
	10 mM EDTA pH 8	1 ml	0,5M

NaOH/SDS:	0,2 M NaOH	2 ml	5M
	1 % SDS	5 ml	10%

KAc/HAc:	3 M KAc	14,7 g	
	2 M HAc	5,7 ml	100%

LiCl:	5 M LiCl	10,6 g	
-------	----------	--------	--

- 20-30 ml 2TY-amp mit einer Kolonie inokulieren und bei 37°C
5-6 h (rec⁺) oder über Nacht (rec⁻) kräftig schütteln.
Zellen abzentrifugieren
10' bei 3000rpm (Tischzentrifuge), Pellet suspendieren in
1 ml GTE,
5' bei RT stehen lassen,
2 ml NaOH/SDS zugeben, mischen und
15"-5' stehen lassen. Nach Zugabe von
1,5 ml KAc/HAc erneut
5' inkubieren bei RT.
10' bei 3000rpm (besser 10'000rpm) abzentrifugieren und
Überstand bei RT mit EtOH ausfällen. Niederschlag in
200 μ l TE lösen. Durch Zugabe von
150 μ l LiCl und Inkubation bei -20°C während
30'-60' werden Proteinkomplexe und ein Teil der hochmolekularen

RNA ausgefällt. Nach Zentrifugation wird der Überstand bei RT mit Ethanol ausgefällt. Diese Präparation eignet sich für die meisten Experimente; für einige Zwecke (Nick-Translation, Bal 31-Deletionen) ist aber eine weitere Reinigung notwendig. Der Überstand der LiCl-Fällung kann mit 5µl RNase A (10mg/ml) während 30' bei 37°C verdaut und mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert werden. Anschliessend wird nochmals bei RT mit Ethanol ausgefällt.

d) Plasmiden Maxipräparation siehe unter M13 Techniken: RF Präparation.

5. M13 Techniken

a) Wirtsbakterien

Die folgenden Wirtsbakterien wurden verwendet: JM103, BMH 71-18, W71-18, BMH 71-18 mutL, ES871, JM109, TG1.

Informationen über diese Stämme finden sich in den folgenden Arbeiten:

- J. Messing, 1983
- Yanisch-Perron et al., 1985
- Carter et al., 1985

b) Vektoren

M13mp10 und M13mp11 replikative (ds) Form (=RF) waren ein Geschenk von M. Billeter, Zürich.

M13mp18 und M13mp19 Phagen waren ein Geschenk von R. Cortese, EMBL, Heidelberg.

c) Nährmedien

Siehe R. Dörig (1986).

d) Transformationen mit CaCl_2 erfolgten nach J. Messing (1983).

Transformationen nach D. Hanahan (1983) wurden durchgeführt, wie bei R. Dörig (1986) beschrieben.

JM109 sollten bis $A_{550\text{nm}}=0,8-0,89$ inkubiert werden (Yanisch-Perron et al., 1985).

Falls mehr als 20µl transfektierte Hanahan-Zellen ausgeplattet wurden, mussten diese, nach 20' Inkubation bei 37°C, 10' bei 4°C und 2000rpm abzentrifugiert und in 200µl 2TY aufgenommen werden.

Für TG1 Zellen wurde nach dem folgenden Protokoll vorgegangen:

Übernachtskultur von TG1 in 1,5ml 2TY bei 37°C schütteln. Mit

- 0,3 ml gesättigter Übernachtskultur
- 30 ml vorgewärmtes 2TY inokulieren und genau
- 2 h bei 37°C stark schütteln. Die Zellen sollten nun eine Dichte von $A_{600\text{nm}}=0,4-0,6$ haben. Zellen bei
- 2000 rpm und 4°C pelletieren, in
- 10 ml TFB resuspendieren,
- 15' auf Eis stehen lassen und bei
- 2000 rpm und 4°C erneut pelletieren. Zellen vorsichtig in
- 2,5 ml TFB suspendieren,
- 100 µl Dimethylformamid (=DMF) (oder DMSO) dazu pipettieren, mischen durch Drehen,

- 5' auf Eis stehen lassen,
- 100 µl DTT zugeben, drehen,
- 10' auf Eis stehen lassen, erneut
- 100 µl DMF (bzw. DMSO) zugeben und drehen,
- 5' auf Eis stehen lassen und dann weiterfahren wie bei Hanahan-Zellen.

e) Präparation von einzelsträngiger DNA

Minipräparation:

Die Methode von Bankier und Barrell (1983) diente als Grundlage für das folgende Protokoll:

Lösungen: 2TY: (siehe R. Dörig, 1986)

PEG/NaCl: 20 % PEG-6000
2,5 M NaCl

TE: 10 mM Tris pH 8
0,2 mM EDTA pH 8

- 20-25 ml 2TY mit einem Tropfen einer Übernachtskultur von Wirtszellen animpfen und in
- 1,5 ml Aliquots aufteilen. Einen isolierten "Plaques" ausstechen und in dieser Lösung bei
- 37°C 5h schütteln (JM109 während 5-7h).
- 1,5 ml in ein Eppendorf RG transferieren und
- 5' zentrifugieren.
- 1,2 ml Überstand sorgfältig in ein frisches Eppendorf RG transferieren und
- 5' zentrifugieren.
- 1 ml Überstand (Rest kann als Phagenstock bei -20°C gehalten werden) zu
- 200 µl PEG/NaCl geben und durch wiederholtes Kippen sorgfältig mischen.
- 15' bei RT stehen lassen,
- 7' abzentrifugieren, Überstand wegschütten, kurz zentrifugieren und Überstand mit ausgezogener Pasteur Pipette vollständig absaugen. Phagen in
- 110 µl TE suspendieren,
- 50 µl Phenol zugeben,
- 30" stark vortexen,
- 5' stehen lassen,
- 30" vortexen, kurz zentrifugieren. Wasserphase mit
- 50 µl Phenol nachextrahieren, zentrifugieren und
- 90 µl Wasserphase nach Zugabe von
- 10 µl 3M NaAc und
- 250 µl Ethanol ausfällen bei -20°C (über Nacht) oder -70°C (1h). Zentrifugieren und Niederschlag mit kaltem
- 80 % Ethanol waschen, trocknen und in
- 25 µl TE aufnehmen.

Maxipräparation:

- 100 ml (bzw 200ml) einer JM109 Kultur mit einer optischen Dichte von $A_{550nm} = 0,5-1$ werden mit
- 50-100 μ l (bzw. 100-200) Phagen aus einer Minipräparation infiziert und
- 6-7 h bei 37°C geschüttelt. Dabei ist es möglich, die Phagen aus dem gefrorenen Phagenstock zu verwenden. Die JM109 Kultur kann aus einer Übernachtskultur angeimpft werden. Bakterien im GSA Rotor
- 10' bei 10'000rpm und RT abzentrifugieren, Überstand abgiessen und nochmals bei RT
- 10' mit 10'000rpm zentrifugieren. Überstand abgiessen,
- $\frac{1}{5}$ Vol PEG/NaCl zugeben und sanft mischen,
- 10' bei RT stehen lassen,
- 10' mit 12'000rpm abzentrifugieren, Überstand ausgiessen und Zentrifugenflasche auf Linsoft auslaufen lassen. Niederschlag in
- 1 ml TE aufnehmen, in Eppendorf RG transferieren und mit je
- 5 μ l RNase (20mg/ml) und
- 5 μ l DNase (20mg/ml) bei 37°C
- 20' inkubieren. Nach Zugabe von
- 200 μ l PEG/NaCl durch Wenden mischen.
- 15' bei RT stehen lassen,
- 5' zentrifugieren, Überstand wegschütten, kurz zentrifugieren und restlichen Überstand mit ausgezogener Pasteur Pipette vollständig absaugen. Niederschlag in
- 300-600 μ l TE aufnehmen,
- $\frac{1}{2}$ Vol Phenol zugeben, vortexen, zentrifugieren,
- 30" vortexen,
- 5' stehen lassen,
- 30" vortexen, zentrifugieren. Wasserphase nochmals mit Phenol extrahieren und mit
- $\frac{1}{10}$ Vol 3M NaAc und
- $2\frac{1}{2}$ Vol Ethanol ausfällen. Niederschlag mit
- 80 % Ethanol waschen, in
- 100 μ l TE aufnehmen und mit
- 1 μ l davon A_{260nm} bestimmen.

f) Präparation von doppelsträngiger DNA (RF Präparation)

Zur Isolation von doppelsträngiger Phagen DNA wurde entweder so vorgegangen wie bei R. Dörig (1986) beschrieben, oder, falls reinere DNA mit grösserem Anteil an Supercoiled-DNA erforderlich war, nach der hier aufgeführten Methode.

Die Aufzucht der Phagen erfolgt gleich wie bei der Maxipräparation der einzelsträngigen DNA, ausser dass nur 4h bei 37°C geschüttelt wird:

- 4 h bei 37°C schütteln. Die Zellen
- 5' bei 4000rpm und 4°C in einem swing out Rotor abzentrifugieren. Der Überstand kann zur Isolation von einzelsträngiger DNA oder als Phagenstock verwendet werden. Die Zellen werden in
- 10-30 ml kaltem 2TY suspendiert, in ein
- 50 ml Polypropylen RG (Sorvall, 03147) transferiert und erneut

- 5' bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Zellen in
 2 ml 5xTE suspendieren. Die weiteren Schritte erfolgen auf Eis.
 200 µl Lysozym (10mg/ml) zugeben, leicht mischen,
 5' stehen lassen.
 200 µl 0,5M EDTA pH 8 zugeben, leicht mischen,
 5' stehen lassen.
 240 µl RNase A (10-20mg/ml) und
 24 µl 10%ige Triton Lösung zugeben und sofort mild schütteln
 30' stehen lassen,
 30' bei 17'000 rpm im SS34 Rotor abzentrifugieren. Überstand
 in einen kleinen Erlenmeyer mit Magnetrührer geben. TE
 zugeben, bis das Volumen genügend gross ist, dass der pH
 gemessen werden kann. Mit
 0,5 M NaOH pH 12,5 einstellen und
 10' bei 25°C und diesem pH leicht rühren. Mit
 1 M Tris pH 8 neutralisieren bis pH 8,5.
 1/9 Vol 5M NaCl und
 1 Vol Phenol, gesättigt mit 3%iger NaCl Lösung, zugeben und
 10' auf dem Magnetrührer extrahieren.
 10' bei 2500rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugieren,
 1-2x Chloroform extrahieren,
 1/5 Vol 5M NaCl und
 1/3 Vol 30%iges PEG-6000 zugeben, mischen und über Nacht bei
 0°C ausfällen.
 60' bei 7000rpm (SS34) abzentrifugieren, in
 4 ml TE aufnehmen,
 2-3x Phenol extrahieren (TE-gesättigt),
 2x Chloroform extrahieren, mit
 1/9 Vol 3M NaAc und
 2,5 Vol Ethanol bei RT ausfällen.

Die M13mp18 und M13mp19 Vektor DNA wurde zusätzlich über CsCl und über ein Agarose low melting Gel gereinigt.

g) Nukleotidlösungen

Ausgangsmaterial:

- dNTP: waren von PL-Biochemicals (je 100mg):
 dATP: 27-1850-03
 dGTP: 27-1870-03
 dCTP: 27-1860-03
 dTTP: 27-1880-03
- ddNTP: waren von PL-Biochemicals (4 µmole bzw. 5mg ddTTP)
 ddATP: 27-4819-01
 ddGTP: 27-4817-01
 ddCTP: 27-4823-01
 ddTTP: 27-4831-01

Puffer: 5xTE: 50 mM Tris pH 8
 1 mM EDTA pH 8

 1xTE: 10 mM Tris pH 8
 0,2 mM EDTA pH 8

Beachte: Nukleotide und Nukleotidlösungen müssen gefroren aufbewahrt werden (Stocklösungen bei -80°C). Die Aufarbeitung der Lösungen erfolgt auf Eis.

dNTPs aufgrund der Angaben des Herstellers in einer Konzentration von 100mM in 5xTE lösen. 0,5 μl in 1ml des entsprechenden Puffers verdünnen:

für pH 7 wurde 10 mM Tris pH 7
 für pH 7,5 10 mM Tris pH 7,5
 für pH 2,0 verdünnte HCl verwendet.

Die Absorption der verdünnten Lösungen wird bestimmt und daraus die effektive Konzentration errechnet.

	λ_{nm}	pH	A_{λ} einer 0,05mM Lösung
dGTP	253	7,0	0,866
dCTP	280	2,0	0,655
dATP	259	7,0	0,76
dTTP	267	7,0	0,48

Lösungen mit H_2O auf 20mM verdünnen (=dNTP \$).

ddNTPs rechnerisch in einer Konzentration von 20mM in 1xTE lösen. Je 2,5 μl in 1ml des entsprechenden Puffers verdünnen, Absorption und effektive Konzentration bestimmen:

	λ_{nm}	pH	A_{λ} einer 0,05mM Lösung
ddGTP	252	7,5	0,58
ddATP	261	7,0	0,685
ddCTP	280	2,0	0,45
ddTTP	267	7,0	0,485

Lösungen mit 0,5xTE auf 10mM verdünnen (=ddNTP \$).

Working solutions (NTP_{ws}) und *chase*

dNTP _{ws} :	dTTP _{ws} (0,5mM):	12,5	μl	dTTP \$	+	487,5	μl	TE
	dCTP _{ws} (0,5mM):	12,5	μl	dCTP \$	+	487,5	μl	TE
	dGTP _{ws} (0,5mM):	12,5	μl	dGTP \$	+	487,5	μl	TE

ddNTP _{ws} :	ddTTP _{ws} (0,5mM):	5	μl	ddTTP \$	+	95	μl	0,5xTE
	ddCTP _{ws} (0,3mM):	3	μl	ddCTP \$	+	97	μl	0,5xTE
	ddGTP _{ws} (0,3mM):	3	μl	ddGTP \$	+	97	μl	0,5xTE
	ddATP _{ws} (0,1mM):	2	μl	ddATP \$	+	198	μl	0,5xTE

chase:	für 1 ml	25	μl	dTTP \$
		25	μl	dCTP \$
		25	μl	dGTP \$
		50	μl	dATP \$
		875	μl	TE

N_0 :		T_0		C_0		G_0		A_0	
	ddTTP _{ws}	5	µl	100	µl	100	µl	100	µl
	ddCTP _{ws}	100	µl	10	µl	100	µl	100	µl
	ddGTP _{ws}	100	µl	100	µl	5	µl	100	µl
N_{mix} :	T_{mix} :	$T_0 : ddTTP_{ws} = 3 : 1$							
	C_{mix} :	$C_0 : ddCTP_{ws} = 3 : 2$							
	G_{mix} :	$G_0 : ddGTP_{ws} = 5 : 4$							
	A_{mix} :	$A_0 : ddATP_{ws} = 5 : 1$							

h) Gelelektrophorese

Lösungen

40% Acrylamid \$:	380	g	Acrylamid
	20	g	Bisacrylamid, Wasser auf
	1	l	lösen ohne zu erwärmen, mit
	20	g	Amberlit MB-1 (mixed bed resin, Serva)
	30'		rühren, filtrieren und bei 4°C lagern.
10x TBE (=10x Seq):	108	g	Tris
	55	g	Borsäure
	9,3	g	EDTA
Top Gel Mix:	75	ml	40% Acrylamid \$
(0,5x TBE)	25	ml	10x TBE
	230	g	Urea ultra pure (BRL), auf
	500	ml	mit H ₂ O auffüllen, bei 4°C lagern.
Bottom Gel Mix:	15	ml	40% Acrylamid \$
(2,5x TBE)	25	ml	10x TBE
	46	g	Urea ultra pure
	5	g	Saccharose ultra pure (BRL)
	5	mg	Bromphenolblau, mit H ₂ O auf
	100	ml	auffüllen, bei 4°C lagern.

Puffergradienten Gel (Biggin et al., 1983)

Vorbereiten der Gelplatten:

Eine Gelplatte 20x40 cm und eine eingeschnittene derselben Grösse (beides unbehandeltes Glas) werden benötigt. Gelplatten 2x mit einem Detergens und 2x mit Ethanol waschen, silanisieren, indem etwas Dimethyldichlorosilan (2%ige Lösung in Tetrachlorkohlenstoff) mit einem Linsoft einmal in Längs- und einmal in Querrichtung aufgetragen wird. Platten 2x mit Ethanol gut waschen und abreiben. Auf jeder Längsseite wird ein 0,3mm dicker Spacer verwendet und die Glasplatten mit Klebeband fixiert.

Giessen des Gels:

Vorbereiten in Erlenmeyerkolben 1:

- 8 ml Bottom Gel Mix
- 16 μ l 25% APS
- 16 μ l TEMED, sofort mischen

Vorbereiten in Erlenmeyerkolben 2:

- 35 ml Top Gel Mix
- 70 μ l 25% APS
- 70 μ l TEMED, sofort mischen

Mit 10ml Messpipette

- 4 ml aus Erlenmeyerkolben 2 aufsaugen, dann
- 8 ml aus Erlenmeyerkolben 1 (in dieser Reihenfolge), ev. einige Luftblasen nachziehen (damit leicht gemischt wird).

Inhalt der Pipette langsam dem Spacer entlang zwischen die Platten giessen. Kurz bevor die Pipette leer wird, Gel horizontal halten und von neuem Top Gel Mix aus Erlenmeyerkolben 2 aufsaugen. Mit diesem wird das Gel fertig gegossen, wobei man mit der Pipette gegen die Gelmitte fährt. Nun wird der Slotformer, der aus demselben Material wie die Spacers besteht, eingeführt. Das Gel soll in fast horizontaler Lage polymerisieren. Das Klebeband am Boden wird für die Elektrophorese mit einer Rasierklinge entfernt, und eine Aluminiumplatte (z.B. 18 x 23 cm) wird auf die saubere Glasplatte fixiert, damit die Wärme besser verteilt wird.

Die untere Pufferkammer wird mit 1 x TBE gefüllt,
die obere mit 0,5 x TBE.

Für kurze Läufe muss eine 20-30 minütige Vorelektrophorese durchgeführt werden.

Die Elektrophorese erfolgt für

kurze Läufe	bei	35-45W	konstant, für
lange Läufe	bei	35W	konstant.

Fixieren und Trocknen

Nach dem Lauf wird das Gel mit der eingeschnittenen Platte unter dem kalten Wasser abgeschreckt, kurz gewendet und die Platten werden getrennt. Das Gel wird auf der einen Glasplatte in je 7,5% Essigsäure und Methanol fixiert. Ab und zu wird die Wanne leicht bewegt. Wenn dabei kein Harnstoff mehr austritt, kann das Gel aus dem Bad genommen werden. Ein 3MM Papier wird daraufgelegt und mit einer Pipette sorgfältig angedrückt. Das Gel, das nun am 3MM Papier haftet, wird auf eine Saranfolie gelegt und im Geltrockner bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

6% Top Gel

Dieses Gel wurde zur Isolation von radioaktiv markierten M13 Einzelstrangproben verwendet:

- 40 ml Top Gel Mix
- 80 μ l 25 % APS
- 80 μ l TEMED

Eine Vorelektrophorese erfolgt während 15'-20' bei 50 W konstant. Die Elektrophorese wird ebenfalls bei 50 W konstant durchgeführt. Auch hier dient eine Aluminiumplatte auf der vorderen Glasplatte der guten Wärmeverteilung.

i) Oligonukleotide

Material

Der 17-mer universelle Primer	5' GTAAAACGACGGCCAGT ³ '
war ein Geschenk von M. Gait, (MRC, Cambridge). Später wurde er von P. Böhlen (Zürich) synthetisiert.	
Das ochre-Oligonukleotid: (coding)	5' CTAAAGTCCACCGCTCTACC ³ ' G
wurde nach der Phosphotri- estermethode manuell synthetisiert.	
Alle folgenden Oligonukleotide wurden von P. Böhlen hergestellt:	
Tyr-Oligonukleotid : (=Oli 2, non-coding)	5' CCTTCGATAGCTCAGTTGG ³ '
Y22Fa Intron Oligonukleotid: (=Oli 4, coding)	5' GTCTACATTTCGTAATCCCAAT ³ '
Y22Fb Intron Oligonukleotid: (=Oli 6, coding)	5' AAGTGTGATCAGATCTGAAAACCT ³ '
△-Intron Oligonukleotid: (=Oli 8, coding)	5' CGACCTATGCATCTACAGTCCACC ³ '

Bemerkung: Die Begriffe *coding* und *noncoding* werden hier so verwendet, wie bei tRNA Genen üblich ist: Der *codierende* DNA Strang dient als Matrize für die tRNA. Der *noncoding* Strang hat die DNA Sequenz, die der tRNA entspricht.

Reinigung der Oligonukleotide

Nach der NH₃ Behandlung muss das Glasgefäß vor dem Öffnen gekühlt werden. Die Lösung wird in ein Falcon (2059) RG transferiert und

- 6x mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wird in Eppendorf RGs aufgeteilt, in der Vakuum Zentrifuge getrocknet und in je
- 100 µl Essigsäure : H₂O (8 : 2) resuspendiert. Proben erneut trocknen, in
- 100 µl H₂O aufnehmen und wieder trocknen. Die Proben werden in
- 500 µl H₂O aufgenommen, abzentrifugiert und der Überstand nach Absorptionsmessung in Aliquots aufgeteilt. Deren Grösse wird so berechnet, dass ein Aliquot auf einen Slot aufgetragen werden kann, wobei bei guter Synthese pro cm Slotbreite nicht mehr als 2 A_{260nm}, bei schlechter Synthese bis zu 10 A_{260nm} aufgetragen werden. Mit 2-Butanol (oder n-Butanol) wird das Volumen auf ca.

- 100 µl eingedickt, und nochmals getrocknet. Oligonukleotid in einer Konzentration von ca.
 1 A_{260nm}/µl lösen und nach Zugabe von
 1/10 Vol 10x TBE und
 1 Vol Formamid Ladepuffer (siehe nächstes Kapitel) auf einem
 20 % Nativ-Gel bei 37 Watt konstant auftrennen.

Beachte: Ein 14 bp Oligonukleotid läuft auf einem 20% Nativ Gel in 1x TBE mit dem Bromphenolblau Marker. Für Oligonukleotide von dieser Länge sollte deshalb ein Formamid Ladepuffer ohne Bromphenolblau verwendet werden. Als Marker wird aber der "normale" Formamid Ladepuffer auf einen freien Slot aufgetragen. Analoges gilt für den Xylen Cyanol Farbmaler und 30-mer Oligonukleotide.

20 % Nativ-Gel

Die Gelplatten werden vorbereitet wie oben beschrieben (0,3mm Spacers):

- 4 ml 10x TBE
 20 ml 40% Acrylamid \$
 20 µl 1% Ethidiumbromid Lösung
 140 µl 25% APS
 40 µl TEMED

Eine Vorelektrophorese wird in 1x TBE mit 0,5 ml/l 1% Ethidiumbromid während 30' bei 37 Watt durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird das Gel auf Saranfolie transferiert. Unter einer UV Lampe kann die Bande auf der Saranfolie angezeichnet werden. Sind die Banden zu schwach, so kann das Gel auf einen UV Screen gelegt werden. Dies erlaubt eine Detektion von kleinsten Mengen. Die Bande wird als ganzes Stück ausgeschnitten und in einem Dialysesack gegen ein grosses Volumen H₂O dialysiert: 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C.

Beachte: Falls die Qualität von Acrylamid oder Tris nicht gut ist, ist die Ausbeute sehr gering. In diesem Fall kann das Oligonukleotid durch wiederholtes Blitzgefrieren in flüssigem Stickstoff und Erwärmen im 80°C Wasserbad aus dem Gel eluiert werden. Anschliessend gegen Wasser dialysieren.

Die dialysierte Oligonukleotidlösung wird mit einer Spritze durch einen vorgespülten Sterilfilter (0,2 oder 4,5µm) gepresst und der Filter wird mit H₂O nachgespült. Absorption bei 260nm messen, Probe trocknen und in einer Konzentration von 10pmole/µl in TE aufnehmen.

Für synthetische Oligonukleotide soll 1 A_{260nm} 20µg/ml entsprechen. Demnach wäre für ein

15-mer	1 A _{260nm}	=	4,3 pmole/µl
20-mer	1 A _{260nm}	=	3,2 pmole/µl
25-mer	1 A _{260nm}	=	2,6 pmole/µl

(Carter et al., 1985)

j) DNA Sequenzieren

(Sanger et al., 1977 und Bankier and Barrell, 1983)

Material

DNA Polymerase I, grosses (Klenow) Fragment: Böhrringer

Deoxyadenosin 5'-[α - 35 S]-thiotriphosphat: Amersham, SJ 264

Primer:	0,2	pmole/ μ l	
TM:	100	mM	Tris, pH8-8,5
	100	mM	MgCl ₂
Formamid Ladepuffer:	15	ml	deionisiertes Formamid
	15	mg	XCFF
	15	mg	BPB
	0,2	ml	0,5M EDTA pH 8

Primer Annealing:

Primer-Mix pro Klon:	1	μ l	Primer (0,2 pmole/ μ l)
	1	μ l	TM
	3	μ l	H ₂ O
Anneal-Mix:	5	μ l	Primer Mix
	5	μ l	Minipräparation DNA

Die Eppendorf RGs mit den einzelnen Proben werden in ein Becherglas, das 80°C-85°C warmes Wasser enthält, gestellt und auf dem Labortisch auf RT abgekühlt. Falls das Becherglas sehr viel Wasser enthält, sollten die Eppendorf RGs während dem Abkühlen einmal kurz zentrifugiert werden, damit nicht alle Flüssigkeit verdunstet. Es ist möglich, das Primer Annealing schon am Vorabend durchzuführen. In diesem Fall wird das Becherglas über Nacht in den 4°C Raum gestellt.

Sequenzierprotokoll

Anneal-Mix kurz zentrifugieren und je

- 2 μ l an die Wand von 4 bereitstehenden deckellosen Eppendorf RGs pipettieren.
- 2 μ l T_{mix} bzw. C_{mix} bzw. G_{mix} bzw. A_{mix} zu je einem der RGs an den Rand pipettieren.
- 2 μ l Klenow/ATP Mix (pro Klon: 0,25 μ l Klenow
5,25 μ l H₂O
1,5-2 μ l [α - 35 S]-dATP)
pro RG pipettieren. Der Reaktionsstart erfolgt durch sanftes Zentrifugieren bei maximal 3000rpm.
- 25' bei RT stehen lassen und während dieser Zeit
- 2 μ l chase an den Rand der RGs pipettieren (darauf achten, dass der Tropfen nicht eintrocknet). Nach Ablauf der 25' wieder sanft zentrifugieren und wieder
- 25' bei RT stehen lassen.
- 4 μ l Formamid Ladepuffer an den Rand pipettieren, zentrifugieren und ca.
- 3' im Wasserbad kochen. Proben direkt auf Sequenziergel laden oder in Eiswasser stellen. Proben, die erst nach längerer Zeit aufgetragen werden, sollten unmittelbar vor dem Auftragen nochmals gekocht werden.

k) M13 Proben

Radioaktiv markierte, einzelsträngige DNA wurde basierend auf den Angaben von Dudler und Travers (1984) nach dem folgenden Protokoll hergestellt:

Grossansatz

- | | | |
|-----|------|---|
| 5 | µl | Maxipräparation DNA (ca. 10µg ssDNA, was bei einer Insertlänge von 300 - 400 Nukleotiden 4 pmole ergibt) |
| 2 | µl | H ₂ O |
| 1-2 | µl | Primer (10-20pmole) |
| 1 | µl | TM. Die Hybridisierung erfolgt wie unter "Sequenzieren" beschrieben. Mit der hybridisierten annealten Probe die gewünschte Menge (z.B.) |
| 50 | µCi | getrockneten Tracer (Deoxyadenosin 5'-[α- ³² P]-triphosphat, z.B. 800Ci/mmol) aufnehmen und |
| 1 | µl | 1,2 mM dGTP/dTTP/dCTP und |
| 1,5 | µl | Klenow dazugeben. Je nach Insertlänge und Menge Tracer |
| 5' | -15' | inkubieren. Der Chase erfolgt durch Zugabe von |
| 1 | µl | 1,2 mM dATP und dauert |
| 15' | -20' | Das Klenow Enzym wird während |
| 15' | | bei 65°C inaktiviert. Zentrifugieren und nach Zugabe von |
| 1,5 | µl | "Klenow-->med Puffer": |
| | | 12,5 µl 5M NaCl |
| | | 87,5 µl H ₂ O |
| | | für Verdauungen mit medium salt Restriktionsenzymen bzw. |
| | | "Klenow-->high Puffer": |
| | | 25 µl 5M NaCl |
| | | 44 µl 1M Tris pH7,5 |
| | | 31 µl H ₂ O |
| | | für high salt Restriktionsenzyme |
| | | und einigen Einheiten des adäquaten Restriktionsenzym |
| | | wird |
| 20' | -60' | bei der entsprechenden Temperatur verdaut. |
| 2 | Vol | Formamid Ladepuffer dazupipettieren, Deckel des Eppendorf |
| | | RGs abschneiden und |
| 5' | | im Wasserbad kochen. Probe auf einem 6% Top Gel |
| | | auftrennen. |

Beachte: Dieser Ansatz kann problemlos verdoppelt oder halbiert werden (für S₁-Mapping z.B. wird nur wenig radioaktive Probe benötigt). Weiter ist es möglich, Minipräparation-DNA zu verwenden. Falls nötig, kann diese in der Vakuum Zentrifuge eingedickt werden.
Für kleine DNA Mengen genügen 10 µCi Tracer.

Das Gel wird nach beendeter Elektrophorese kurz exponiert, die gesuchte Bande wird ausgeschnitten und entweder in H₂O direkt in einem Eppendorf RG eluiert oder mit einigen ml H₂O in einen Dialysesack gelegt. In diesem Fall wird die DNA durch Elektrophorese in 0,5x TBE in einem Agarose Minigel Tank (40-80mA, während 1-2 h und 5' nach Umpolen) eluiert. Die im Wasser gelöste DNA wird aus dem Dialysesack in eine Spritze aufgesogen und durch einen vorgespülten Sterilfilter von Polyacrylamid Stücken gereinigt. Danach wird mit 2-Butanol eingedickt.

Das restliche Butanol wird mit Ether extrahiert oder direkt in der Vakuum Zentrifuge abgedampft. Die Probe wird mit Ethanol ausgefällt, getrocknet und im gewünschten Puffer aufgenommen.

1) Test auf komplementäre DNA Stränge:

Wird in eine einzige Restriktionsstelle des M13 Phagen kloniert, so lässt sich die Orientierung der inserierten DNA nicht vorhersagen. Es ist aber möglich, mit kleinem Aufwand Phagen (DNA) zu identifizieren, die die Insertion in umgekehrter Orientierung tragen, da ihre einzelsträngige Insert DNA dann komplementär ist. Die hybride DNA läuft auf einem Agarose Gel langsamer.

Es sollten mehrere Phagen aufgezogen werden (Minipräparationen).

- 1,5 µl DNA von Klon a und
- 1,5 µl DNA von Klon a (als Kontrolle), bzw. b, c, d... und
- 3 µl 2x salts: 100 mM Tris-HCl pH7,5
100 mM MgCl₂
500 mM NaCl
- in einem Eppendorf RG mischen und mit einer
- 25 µl Glaskapillare aufziehen. Die Glaskapillare wird zugeschmolzen, indem zuerst der hintere Drittel 2x über die Bunsenbrennerflamme gezogen und zugeschmolzen wird. Falls die Kapillare dicht ist, zieht sich beim Abkühlen der Tropfen zurück. Nun wird die untere Öffnung zugeschmolzen und die Kapillaren werden in einem Glas RG
- 1 h bei 68°C im Wasserbad inkubiert.
- 2 µl Ficoll Ladepuffer (ohne XCFF) oder Glycerin Ladepuffer (ohne XCFF) zugeben und auf einem
- 1 % Agarose Gel mit
- 0,5 x TBE oder auf einem
- 0,7 % Agarose Gel mit
- 1 x TBE bei
- 40 mA konstant auftrennen. Agarose Gel und Laufpuffer sollten
- 2 µg/ml Ethidiumbromid enthalten und das Gel darf nicht zu weit laufen, da sonst die Banden zu diffus werden.

Bemerkung: Die Hybridisierung kann auch im Eppendorf RG erfolgen. Dann sollten die Proben aber nach jeweils 15' kurz zentrifugiert werden, damit sie nicht zu stark eintrocknen.

6. Screenen der λ Bank

Material:

Die verwendete rekombinante λ Genbank enthält *Drosophila melanogaster* (Canton S) Insertionen in Lambda Phagen EMBL 4 (Frishauf et al., 1983). Sie war ein Geschenk von V. Pirrotta und wurde von H. Amrein zur Verfügung gestellt.

Die rekombinante λ Genbank wurde so ausgeplattet, dass ca. 15'000 Plaques auf einer Petrischale mit einem Durchmesser von 13,5 cm gescreent werden konnten.

Die Methode der Amplifikation von λ Phagen wurde von S. Woo (1979) beschrieben.

NZCYM: siehe unter 4.a)

NZCYM Platten: 15 g Bacto Agar
1 l NZCYM

NZCYM Top: 0,7 g Agarose
100 ml NZCYM

Filter: Colony/Plaque Screen Hybridization Transfer
Membrane, NEN: NEF-978A

Maltose: 20 % sterilfiltriert.

Protokoll:

Die folgende Methode diente zur Isolation der tDNA^{Tyr} enthaltenden Klone:

Tag 1:

Q₃₅₈ Wirtsbakterien in
50 ml NZCYM und
0,5 ml 20% Maltose über Nacht bei 37°C schütteln.
Filter und Whatman 3 MM Papier autoklavieren.

Tag 2:

Bakterien abzentrifugieren, in
4 ml 10mM MgSO₄ aufnehmen und bei
4°C aufbewahren. Die autoklavierten Filter werden in eine
Lösung eingetaucht, die
2 ml Wirtszellen in MgSO₄ und
80 ml NZCYM (ohne Maltose!) enthält. Wenn die Filter gut befeuchtet
sind, werden sie mit der konkaven Seite (nasser Filter, bzw.
konvexen Seite des trockenen Filters) gegen oben auf ein
steriles Whatman 3MM Papier gelegt und an der Luft liegen
gelassen. NZCYM Platten halb offen
4 h auf 37°C stellen.
300 µl der Q₃₅₈ Wirtszellen in MgSO₄ werden mit dem benötigten
Volumen Phagen Genbank während
20' bei 37°C inkubiert (ohne Schütteln) und mit
9 ml NZCYM Top, welcher nach dem Schmelzen auf
48°C gehalten wurde, auf eine grosse NZCYM Platte ausgeplattet.
Diese wird
12-18 h bei 37°C inkubiert. Platten
2 h auf 4°C stellen und gleichzeitig frische NZCYM Platten halb
offen auf 37°C. Filter mit der konvexen Seite (trockener
Filter) auf die λ Plaques legen und während
5' saugen lassen. In dieser Zeit mit einer Nadel Markierungen
anbringen. Von jeder Platte sollten auf diese Weise 2-3
Abzüge gemacht werden. Die Filter werden nun mit den

Plaques gegen oben auf eine frische Platte gelegt und nochmals

- 12-18 h bei 37°C inkubiert. Platten mit Filter nun
2 h auf 4°C stellen, Filter wegnehmen und Lysieren.

Die Lyse kann entweder auf 3MM Papier, gesättigt mit den entsprechenden Lösungen erfolgen, oder auf einer Saranfolie in 3-4 ml der entsprechenden Lösungen. In jedem Fall werden die Filter mit den Phagen gegen oben inkubiert und zwischen zwei Inkubationen kurz auf Haushaltpapier gelegt. Damit wird der alte Puffer abgesogen.

- 0,5 M NaOH, 2 mal 5'
1 M Tris pH 7,5, 2 mal 5'
3-4 ml Proteinase K Lösung: 200 µg/ml Proteinase K
10 mM Tris pH 7,5
5 mM EDTA
0,5 % SDS (Dieses erst nach dem Wasser begeben) auf eine gespannte Saranfolie pipettieren und Filter auf den Tropfen legen.
30' inkubieren.
1 M Tris pH 7,5, 2 mal 2'. Filter bei RT auf Haushaltpapier
30' trocknen und
2-4 h im Vakuumofen bei 80°C backen.

Waschen der Filter

- 16-20 h in 3x SSC / 0,5% SDS: 450 ml 20x SSC
30 ml 10 % SDS
ad 3 l H₂O
bei 65°C schütteln.
3-4x Puffer wechseln.

Vorhybridisierung

- | | |
|---------------------------|---|
| 6 x SSC | für 50 ml |
| 1 x Denhardt's | 15 ml 20x SSC |
| 0,5 % SDS | 1 ml 50x Denhardt's |
| 100 µg/ml E. coli tRNA | 2,5 ml 10% SDS |
| 0,05 % NaPyrophosphat | 5 mg E. coli tRNA |
| (tetra-Natriumdiphosphat) | 0,5 ml 5% Na ₄ P ₂ O ₇ |
| | ad 50 ml H ₂ O |

oder

- | | |
|-----------------------|---|
| 3 x SSC | 7,5 ml 20x SSC |
| 2 % SDS | 10 ml 10% SDS |
| 0,05 % NaPyrophosphat | 0,5 ml 5% Na ₄ P ₂ O ₇ |
| | ad 50 ml H ₂ O |
- 2 h bei 37°C inkubieren.

Hybridisierung

Es können verschiedene Methoden angewendet werden, wobei diejenige von Church und Gilbert (1984), beschrieben auch bei R. Dörig (1986), die besten Resultate lieferte. Es werden hier deshalb nur noch die anderen Methoden aufgeführt:

6	x	SSC	für 50 ml:
2	%	SDS	15 ml 20x SSC
0,05	%	NaPyrophosphat	10 ml 10% SDS
			0,5 ml 5% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
			ad 50 ml H_2O

oder

5	x	SCP	für 50 ml:
0,3	%	Sarkosyl	12,5 ml 20x SCP
			0,5 ml 30% Sarkosyl
			ad 50 ml H_2O

20x SCP:	117	g	NaCl
	7,4	g	EDTA
	85	g	Na_2HPO_4 , (wasserfrei)
	ad 1	l	H_2O

- 12-18 h bei der geeigneten Temperatur hybridisieren, Filter mehrmals bei RT in 6x SSC / 0,05 % NaPyrophosphat waschen und im selben Puffer während
- 1 h bei der Hybridisierungs-Temperatur und ev. noch in 6x SSC / 0,05 % Na-Pyrophosphat / 2 % SDS während
- 1 h bei der Hybridisierungs-Temperatur

oder

- 20' Filter mehrmals bei RT in 1 x SCP / 0,3 % Sarkosyl und bei der Hybridisierungs-Temperatur im selben Puffer waschen.

Bemerkungen

1) Falls eine gute Hybridisierungs-Probe zur Verfügung steht, lohnt sich das Amplifizieren der Phagen auf den Filtern nicht. In diesem Fall müssen die Filter auch nicht so intensiv gewaschen werden, wie das in der einen Methode geschildert ist. Es können dann auch problemlos Nitrocellulose Filter verwendet werden. In diesem Fall erfolgt die Lyse in 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl und das Neutralisieren in 1 M Tris pH 7 / 1,5 M NaCl.

2) Die Hybridisierung nach Church und Gilbert (1984) ergab die stärksten Signale.

Plaque Purification

Positive Klone werden mit einer sterilen Pasteur Pipette ausgestochen und in 1 ml SM und 20 μ l CHCl_3 1 h stehen gelassen. Je nachdem, wieviele Klone gereinigt werden, kann jeder einzeln oder, wie unter 4.a) beschrieben, mit einem geeigneten Titer ausgeplattet werden. Meist ist eine zweite Plaque Purification notwendig.

7. S_1 -Mapping

Die Methode von Dudler und Travers (1984) wurde in den Grundzügen übernommen und nach Treisman et al. (1982) und Maniatis et al. (1982) modifiziert.

Je 10'000 bis 50'000 cpm einer M13 Probe, die mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ oder $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ von einer spezifischen Aktivität von 400-1500 Ci/m mole hergestellt wurde, dienten als Probe. Die Kriterien für die Wahl der spezifischen Aktivität waren die folgenden:

- 1) Für kurze Proben wurde eher eine höhere spezifische Aktivität gewählt.
- 2) Zum Nachweis von seltenen Transkripten wurde eine höhere spezifische Aktivität gewählt.

Die Menge der eingesetzten M13-Probe hängt von ihrer spezifischen Aktivität, ihrer Länge und von der Menge der gesuchten Transkripte ab.

Nukleasen S_1 von Böhrringer, Sigma, Pharmacia und BRL wurden verwendet. Diejenige von BRL erwies sich im Preis-Leistungsverhältnis als die Beste.

Die benötigte Menge Nuklease S_1 hängt von verschiedenen Faktoren ab:

- 1) Menge eingesetzter RNA und DNA
- 2) Verdauungs Temperatur
- 3) Falls nur die Exonuklease-Aktivität benötigt wird, genügen schon 50 U für 5-10 μ g RNA. Ist man jedoch auf die Endonuklease Aktivität angewiesen, müssen bis zu 1'000 U pro 2 μ g RNA eingesetzt werden, damit im Loop der Probe geschnitten wird. Speziell dann, wenn dieser Loop noch Sekundärstrukturen ausbildet und dadurch die Anzahl möglicher Schnittstellen für die Nuklease S_1 sehr klein wird.

Für die negative Kontrolle muss mindestens dieselbe Menge negative RNA (z.B. rRNA von *E.coli*) eingesetzt werden. Die Kontroll-RNA beim Nachweis der tRNA^{Tyr} Vorläufer bestand aus derselben Menge *E. coli* rRNA und einigen Nanogrammen reiner *Drosophila* tRNA^{Tyr}-G. Nur so konnte gezeigt werden, dass Nuklease S_1 bei partiellen Hybriden die DNA Probe im Intron verdaut.

Die benötigte Menge Enzym muss deshalb für solche Experimente jedesmal ermittelt werden.

Das folgende Protokoll diente sowohl dem Nachweis von tRNA^{Tyr} Vorläufer in Kern-RNA aus verschiedenen *Drosophila* Stadien, als auch von poly(A)⁺-RNA aus diesen Stadien:

- DNA Probe in 10 mM Pipes pH 6,8
 0,4 M NaCl
 1 mM EDTA pH 8
 lösen, abzentrifugieren, in ein neues Eppendorf RG transferieren und von einem Aliquot cpm messen. Die benötigte Menge auf die erforderliche Konzentration (1000-5000 cpm/ μ l) mit demselben Puffer verdünnen.
- 10 μ l DNA Probe zu
 0-1 μ l RNA Probe geben und gut lösen.
 10 μ l deionisiertes Formamid dazugeben und
 5' in ein
 85°C Wasserbad stellen. Von dort direkt ins Hybridisierungs Wasserbad transferieren. Die Hybridisierung erfolgt je nach Probenlänge und GC-Gehalt bei unterschiedlichen Temperaturen, z.B.
 42°C 6h bis über Nacht.
- 190 μ l eiskühlte S₁-Lösung: 30 μ l 7x S₁-Puffer
 ad 190 μ l Nuklease S₁
 μ l H₂O
 (7x S₁-Puffer 1,5 M NaCl
 5 mM ZnSO₄
 0,5 mM NaAc pH 4,5)
 zugeben, Proben auf Eis stellen, vortexen, zentrifugieren und bei
 25-28°C während
 1 h inkubieren. Die Verdauung wird durch Zugabe von
 33 μ l 4 M NH₄Ac
 100 mM EDTA und
 2 μ l *E. coli* tRNA (8 μ g) auf Eis gestoppt, mit
 100 μ l Phenol / Chloroform (1:1) 1x extrahiert und
 200 μ l Probe mit
 200 μ l Isopropanol während
 15' bei -70°C (Luft) ausfällen. Zentrifugieren, trocknen und in
 1-2 μ l TE lösen.
 2,5 Vol Formamid Ladepuffer dazugeben. Proben
 5' kochen und definierte Menge auf ein
 6 % Sequenzier-Gel auftragen. Das Gel wird nach dem Lauf fixiert, getrocknet und exponiert.

Für stabile DNA-RNA Hybride empfiehlt es sich nach dem folgenden Protokoll zu hybridisieren:

- 2 μ l RNA (5-10 μ g) in H₂O
 16 μ l Formamid (deionisiert, Fluka)
 2 μ l 10x Puffer (10x Puffer: 4 M NaCl
 10 mM EDTA
 100 mM PIPES pH 6,5)
 0,5-1 μ l markierte DNA Probe
 Die DNA Probe wird mit Formamid und 10x Puffer als Master Mix angemacht und zu den RNA Proben gegeben. Bei

30°C 5' im Wasserbad denaturieren und sofort auf
 50°C stellen. Die Hybridisierung erfolgt so während
 6-12 h. Das weitere Vorgehen ist gleich, wie oben beschrieben.

8. Primer Extension

Als Primer wurde eine radioaktiv markierte M13 Probe benutzt. Bei der Herstellung dieser Probe ist darauf zu achten, dass mit einem Restriktionsenzym so geschnitten wird, dass das entstehende 3' Ende komplementär zur RNA ist. D. h. es kann nicht im multicloning site geschnitten werden.

Die Hybridisierung der Probe erfolgt wie beim S₁ Mapping.

Die im folgenden aufgeführte Methode wurde in den Grundzügen von Treisman et al. (1982) übernommen:

Lösungen

		für 1ml		
TNE 8,3:	10 mM Tris-HCl pH 8,3	10 µl	1	M
	1 mM EDTA	2 µl	0,5	M
	100 mM NaCl	20 µl	5	M
		968 µl	H ₂ O	
		für 100µl		
2x RT Puffer:	100 mM Tris-HCl pH 8,3	10 µl	1	M
	16 mM MgCl ₂	1,6 µl	1	M
	10 mM DTT	0,44 µl	2,25	M
	1 mM dNTPs	20 µl	5	mM
	750 U/ml RNasin	2,6 µl	19	U/µl

Die Reverse Transkriptase war von Stehelin, Basel.

Weiteres Vorgehen

Die Hybridisierung wird durch Zugabe von
 180 µl eisgekühltem 0,3 M NaAc und
 500 µl Ethanol abgebrochen. Die Proben werden bei
 -80°C ausgefällt, abzentrifugiert und getrocknet. Aufnehmen in
 5 µl TNE 8,3 und
 5 µl 2x RT Puffer zugeben, vortexen, kurz zentrifugieren und mit
 5 U Reverse Transkriptase Reaktion starten. Bei
 40°C 1h inkubieren. Die Aufbereitung der Proben und die Gel-
 Elektrophorese erfolgte wie beim S₁ Mapping.
 Als Längenmarker wird derjenige Klon sequenziert, der auch
 für die Primersynthese gebraucht wurde. Falls diese zu
 wenig Sequenzen am 5' Ende des untersuchten Transkripts
 enthält, soll ein Klon verwendet werden, der dieselbe 5'
 Sequenz, aber mehr 3' Sequenz ergibt.

9. "in situ" Hybridisierung

"in situ" Hybridisierungen an Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster* wurden nach Pardue und Gall (1975) und T. Schmidt (1980) durchgeführt. Die Quetsch-Präparate waren ein Geschenk von T. Schmidt, Zürich. Als Proben wurden [^{35}S] markierte M13- oder nick-translierte Proben verwendet. Die Identifikation der Bänder erfolgte nach G. Lefevre (1976).

10. Übrige Techniken

- Southern und Northern Transfers (Southern, 1975) auf *GeneScreen* oder *GeneScreen^{plus}* (NEN: NEF-972 bzw. NEF-976) wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde die Methode von Church und Gilbert (1984) verwendet, wie sie bei R. Dörig (1986) beschrieben ist.
- Restriktionsverdauungen wurden mit den Puffern von Maniatis et al. (1982) durchgeführt, wobei für viele Verdauungen zusätzlich 2mg/ml BSA verwendet wurde (S. Rusconi, pers. Mitteilung).
- Bal31 Deletionen und Nick-Translationen wurden ebenfalls nach Maniatis et al. (1982) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente Minipräparation DNA, die nach der LiCl Fällung mit 5µl RNase A (20mg/ml) 20' bei 37°C verdaut und anschliessend mit Phenol / Chloroform (1:1) extrahiert und mit Ethanol gefällt wurde. Für die Nick-Translation erwies es sich als besser, nur 80 µCi Tracer (800-3'000 Ci/mole) pro 0,5 µg DNA einzusetzen. Nick-Translationen mit [^{35}S] markiertem Tracer wurden während 4 h bei 16°C inkubiert.
- Für die gezielte Mutagenese mit M13 fand die *double primer* Methode von Norris et al. (1983) und Zoller and Smith (1984) Anwendung. Es wurde nach dem Protokoll von Carter et al. (1985) und R. Dörig (1986) vorgegangen.

III. R E S U L T A T E

1. Transfer-RNA^{Tyr} Sequenzanalyse

Das amber Terminationscodon der TMV messenger-RNA wird vom G-Isoakzeptor der *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} supprimiert (M. Bienz, 1981). Der Q-Isoakzeptor liest dieses Terminationscodon hingegen nicht (Bienz und Kubli, 1981; B. Suter, 1982). Bisher war bekannt, dass sich die zwei Isoakzeptoren in der Position 34, der Wobble Base, unterscheiden (obige Zitate und Wosnik and White, 1979). Da aber nicht die ganzen Sequenzen dieser beiden Isoakzeptoren ermittelt waren, blieb unklar, ob die unterschiedliche Suppressions-Aktivität auf dieser Modifikation allein beruht.

Der Q-Isoakzeptor der *Drosophila* Mutante *su(s)²* kann im Unterschied zum Wildtyp Isoakzeptor das TMV amber Codon lesen (M. Bienz, 1981; B. Suter, 1982; B. Dauwalder, 1984). Da sich die beiden Isoakzeptoren in ihrer Anticodon Sequenz aber nicht unterscheiden (B. Suter, 1982), sollte ein Sequenzunterschied im restlichen Teil der tRNA vorhanden sein. Es wurden deshalb die beiden tRNA^{Tyr} Isoakzeptoren von Wildtyp Fliegen und von *su(s)²* Fliegen gereinigt und sequenziert. Da mit der angewandten Methodik aber kein Unterschied zwischen den entsprechenden Isoakzeptoren von *su(s)²* und von Wildtyp Fliegen gefunden wurde, wird erst in der Diskussion auf diese Befunde eingegangen.

Der grösste Teil der Sequenzen konnte nach der Methode von Stanley und Vassilenko (1978) ermittelt werden. Die starke Sekundärstruktur an der Basis des TYC Stammes (Übergang zum Extraarm) erschwert die Auftrennung der Fragmente, die durch einen Bruch in dieser Region entstanden sind. Diese Probleme konnten dadurch gelöst werden, dass ein Formamid Sequenziergel verwendet wurde (Brownlee and Cartwright, 1977). Die dazugehörenden Basenanalysen sind in Abbildung 1 gezeigt. Daneben diente das chemische Sequenzierverfahren nach Peattie (1979) zur Bestätigung der Sequenz. Diese Methode eignet sich vor allem deshalb, weil als Ausgangsmaterial auch halbe tRNA Moleküle verwendet

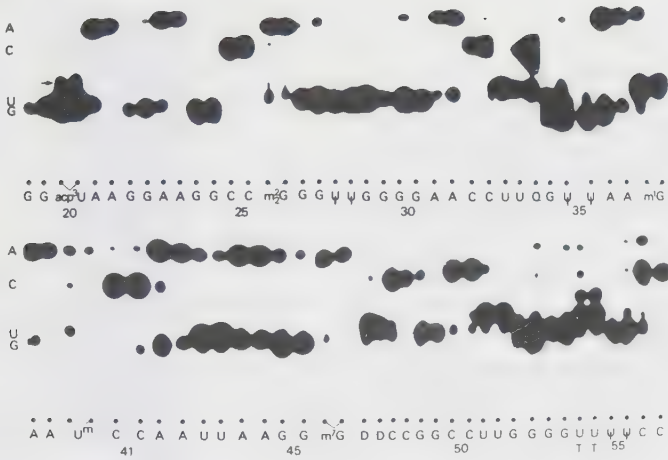
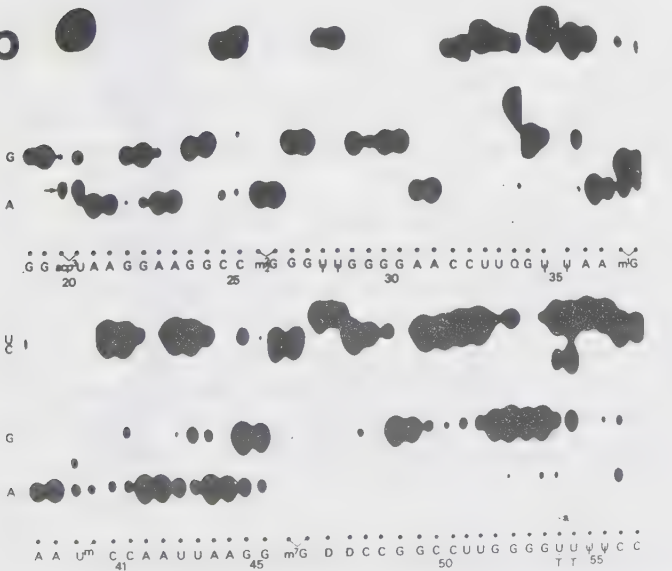
a**b**

Abb. 1:
 Basenanalyse der 5' Enden von 5'-[³²P] markierten Fragmenten der tRNA^{Tyr-G} und -Q Isoakzeptoren von *Drosophila melanogaster*. Abwechslungsweise sind jeweils zuerst der Q-, dann der G Isoakzeptor gezeigt. Die Position der Nukleotide in der tRNA sind in 5er Schritten angegeben. Dünnschicht Chromatographie: (a) erste Dimension, (b) zweite Dimension. Laufmittel nach Silberklang et al. (1979).

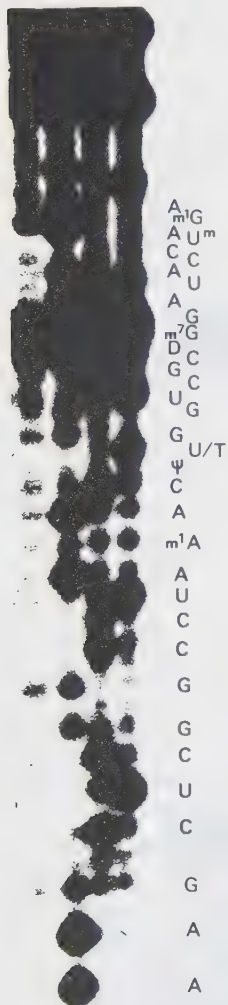
werden können. So wird es möglich, trotz Modifikationen, das ganze Molekül mit dieser Technik zu sequenzieren. Diese endmarkierten tRNA Hälften können durch milde Verdauung mit Nuklease S₁, Markierung mit 5'-[³²P]-pCp und Reinigung über ein Sequenziergel hergestellt werden (Suter et al., 1986; ausführlich beschrieben bei B. Suter, 1982). Es scheint lohnenswert hier festzuhalten, welches Bild die einzelnen Modifikationen bei der Sequenzanalyse ergeben. Die Modifikation m¹A inhibiert die Spaltung in der A Reaktion drastisch. Die modifizierte Base m⁷G führt zu einer sehr starken, Anilin induzierten Spaltung in allen vier Kolonnen (vergl. Wintermeyer and Zachau, 1970; Simsek et al., 1973). Bei einer anderen G Modifikation, m¹G, ist zusätzlich in der U Kolonne eine schwache Bande sichtbar. Die Modifikation acp³U hat eine erhöhte Spaltung in der U- aber auch in der C-Reaktion zur Folge, währenddem nach Ψ nicht gespalten wird. Eine andere U Modifikation, D (dihydro-Uridin), bewirkt eine starke U-Bande. Die deutliche Bande bei U^m zeigt klar, dass sich die Sequenz der *Drosophila* tRNA^{Tyr} Isoakzeptoren in dieser Modifikation von anderen tRNA^{Tyr} Sequenzen unterscheidet (Sprinzl et al., 1985). Als Beispiel einer chemischen Sequenzanalyse ist in Abbildung 2 die Sequenz der 3' Hälfte des G-Isoakzeptors gezeigt.

In vivo Markierung und Verdauung der gereinigten tRNA^{Tyr} Isoakzeptoren diente der Identifikation des 5' terminalen Nukleotides (pCp), des Dinukleotides U^mpCp in Position 39 und 40, und der Bestätigung der Modifikationen acp³Up (3-(3-amino-3-carboxypropyl)Uridin) und Qp. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 gezeigt. Das U in Position 54 ist in beiden Fällen stark untermethyliert. Aus diesen Analysen ergab sich die vollständige tRNA^{Tyr} Sequenz, wie sie in der Kleeblattstruktur in Abbildung 4 dargestellt ist.

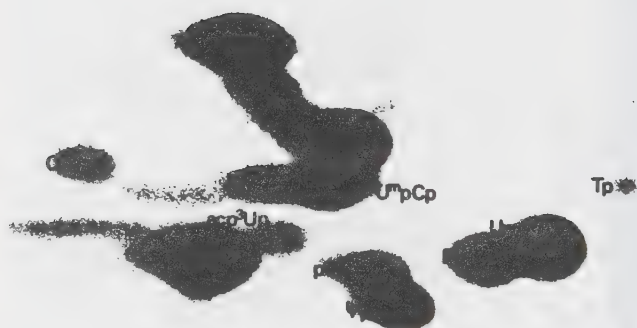
2. Isolation und Struktur der tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila*

Bisher konnte bei *Drosophila melanogaster* keine echte Suppressor tRNA nachgewiesen werden. Transfer-RNA abhängige nonsense Suppressoren wären aber aus mehreren Gründen wünschenswert (siehe dazu R. Dörig, 1986). Eine Mutation in einem tRNA^{Tyr} Gen, das die Wobble Position G in

G A C U



a



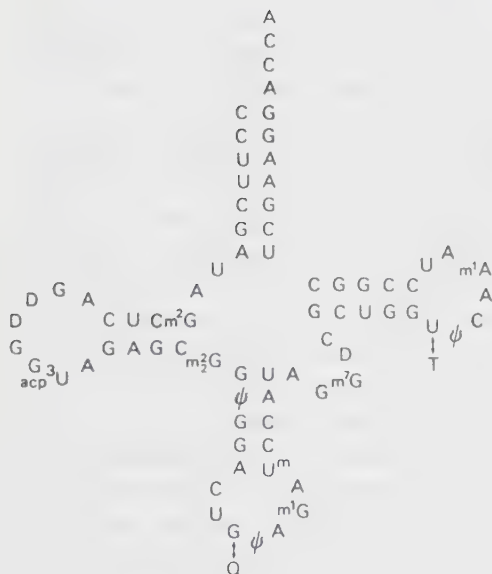
b



Abb. 3:

Basenanalyse von *in vivo* (homogen) markierter tRNA^{Tyr-Q} (a) und tRNA^{Tyr-G} (b). Dünnschicht Chromatographie nach S. Nishimura (1979). Erste Dimension von unten nach oben, zweite Dimension von links nach rechts.

Abb. 4:
Kleeblattstruktur der
tRNA^{Tyr}-G und
tRNA^{Tyr}-Q
Isoakzeptoren von
Drosophila melanogaster



ein C überführt, ergibt eine amber nonsense Suppressor tRNA. Analog dazu führt eine Transversion von G zu U zu einer ochre Suppressor tRNA. Da es möglich ist *Drosophila* zu transformieren (Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982), kann ein nonsense Suppressor Stamm von *Drosophila melanogaster* konstruiert werden, indem ein *in vitro* mutagenisiertes tRNA^{Tyr} Gen wieder in das *Drosophila* Genom zurück gebracht wird. Die unten beschriebenen tRNA^{Tyr} Gene der Region 22F dienten dazu als Ausgangsmaterial. Sie wurden durch gezielte Mutagenese in M13 zu amber und ochre nonsense Suppressor tRNA Genen mutiert und zur Charakterisierung von potentiellen nonsense Mutanten verwendet (R. Dörig, 1986).

Die tRNA^{Tyr} Gene des *Drosophila melanogaster* Genoms zeigen eine ungewöhnliche Anordnung. Betrachtet man diejenigen Loci, die sowohl von Dudler et al. (1981) als auch von Hayashi et al. (1982) durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen wurden - 22F, 28C, 41AB, 85A -, so fällt auf, dass in diesen Regionen keine anderen tRNA Gene lokalisiert sind

(E. Kubli, 1987). Die Region 22F von *Drosophila* enthält den *decapentaplegic* Komplex (*DPP-C*; Spencer et al., 1982), der während der Embryogenese am Aufbau der dorso-ventral Unterschiede beteiligt ist. Später ist dieser Komplex für die korrekte Morphogenese der Imaginalscheiben notwendig (für Referenzen siehe Diskussion). Bei der Klonierung des *DPP-C* wiesen Gelbart et al. (1985) tRNA Gene nach. Mit Hilfe radioaktiver tRNA^{Tyr} Proben konnten diese als tRNA^{Tyr} Gene identifiziert werden. Der λ - Phage 22F81 wurde zusammen mit der Restriktionskarte (Abb. 5a) von Hoffmann und Gelbart zur Verfügung gestellt. Die Restriktionsfragmente, die tRNA^{Tyr} Gene enthalten, wurden subkloniert und sequenziert. Die beiden Gene Y22Fa und Y22Fb sind durch 2,4 kb DNA voneinander getrennt. Abbildung 5b zeigt die Organisation der tRNA^{Tyr} Gene, wie sie aus der Sequenzanalyse (Abb. 5c) hervorgehen. Die Pfeile geben die mögliche Transkriptionsrichtung an. Beide Gene können für die reife tRNA^{Tyr} codieren und beide sind durch ein Intron unterbrochen. Erstaunlicherweise unterscheiden sich diese Introns aber sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz. Bisher galt die folgende Regel: Introns in verschiedenen tRNA Genen, die für denselben Isoakzeptor codieren, sind innerhalb einer Art sehr ähnlich (Sharp et al., 1985).

Die Lokalisation dieser tRNA^{Tyr} Gene in der genetisch definierten Kontrollregion des *DPP*-Komplexes (Gelbart et al., 1986), ihre enge Nachbarschaft mit den Haupttranskripten dieser Region (siehe später) und die ungewöhnliche Struktur dieser tRNA Gene werfen die Frage nach Struktur und Organisation der übrigen tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* auf. Es wurden deshalb weitere tRNA^{Tyr} Gene isoliert und charakterisiert. Ein λ -Phage, der bei der Klonierung des *DPP-C* isoliert wurde (λ Y85Ade; ursprüngliche Bezeichnung 16-7), wurde ebenfalls von Hoffmann und Gelbart zur Verfügung gestellt. Die λ -Phagen Y28C (ursprüngliche Bezeichnung λ 114) und λ Y85Aabc (ursprüngliche Bezeichnung λ 7) wurden aus der Canton S Genbank von V. Pirrotta isoliert. Zur Identifikation wurde eine M13 Probe des Gens Y22Fb verwendet sowie kinasierte Oligonukleotide, die entweder einen Teil der tDNA^{Tyr} enthalten (Oli 2) oder komplementär sind zu einem der

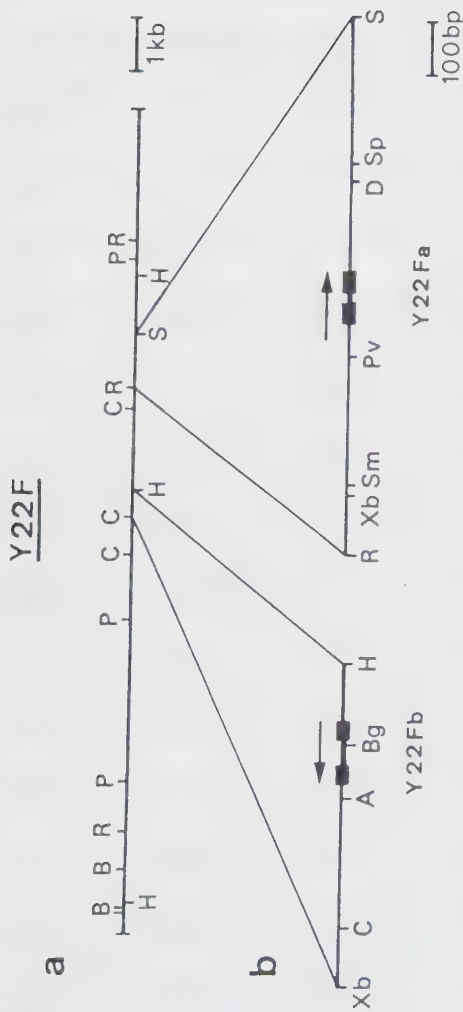


Abb. 5:

Struktur der Region Y22F

A: Acc I B: Bam HI Bg: Bgl II C: Cla I D: Dra I H: Hind III P: Pst I
 Pv: Pvu II R: EcoR I S: Sal I Sm: Sma I Sp: Sph I Xb: Xba I

a: Restriktionskarte des λ Phagen nach Gelbart et al. (1985)

b: Feinstruktur der tRNATyr enthaltenen Restriktionsfragmente wie sie aus der Sequenzanalyse (c) hervorgeht. Die codierenden Sequenzen sind als ausgefüllte Flächen eingezeichnet, die Introns als dick ausgezogene Linie. Die beiden tRNATyr Gene sind bezeichnet als Y22Fa und Y22Fb. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an.

c: (folgende Seiten): Sequenz der tRNATyr Gene und flankierender Regionen. Es ist jeweils der nicht codierende Strang angegeben. Unterstrichen ist die Sequenz vom 5' Ende des Gens bis zum 3' Ende (inkl. Intron). Die Sequenz homolog zur reifen tRNA ist schräggestellt.

Y22Fa

GAATTCCTGG	ACCTCGGGCC	ACTCGCCCGA	TAAGACGGAT	CGTGTCTTCT
10	20	30	40	50
GCGCGCCTGT	GCGATGATTC	ACTTGGTCCG	GTTACCGAAT	CTTCGGGCCA
60	70	80	90	100
CAGGCGATGC	TTCTAGACTA	AACTTGGTTC	CCCGGGGAGA	TGACTCACGG
110	120	130	140	150
CCGGCGTTTA	CTAGGTGGCC	ACGTTAATTG	TCGCCCCCGA	TGCGCACTGT
160	170	180	190	200
CTGTGTTTAC	ACCCGGCGCC	CTTCTTTTCAT	CTGGCCGAAA	ATAAAAAACA
210	220	230	240	250
GAAACCTGAA	AACAATCGGC	TTTGCATTTCG	ATATTCACCTG	CTGGCTCTGC
260	270	280	290	300
ATAAAGTGAG	GCTCATTTCC	CCCCAAATCA	CCTCCACGCC	GACGAAATAC
310	320	330	340	350
CGCCACTTAA	ATTTGTCTCA	GCTGATAAGT	TGTCTTTCAC	TCGGGTTGTT
360	370	380	390	400
TATGAACTCG	TTTTGCAGCG	AGCCATATAT	AGACCTTCGA	TAGCTCAGTT
410	420	430	440	450
GGTAGAGCGG	TGGACTGTAG	ATTGGGATTA	CGAATGTAGA	CATCCATAGG
460	470	480	490	500
TCGCTGGTTC	AAATCCGGCT	CGAAGGATCG	GAAAAATTTT	TTTTCCATAT
510	520	530	540	550
ACCTGAAAAG	TATTGCGAAA	AGTTTGGATT	AAATTGCATT	TCTAAAAATG
560	570	580	590	600
CATTTTTGTC	AGTCATATTG	AAGTAGCGAG	CACTATATCT	TAACGTGTAA
610	620	630	640	650
TATAATAAAC	TTTACACTTC	TTAGCTGAT	AAAGGAAAGA	CAATGAATTT
660	670	680	690	700
TAAACCAAAA	TCTATATAGA	CCGATACATC	AAGCATGCAT	TCTTCTAAAA
710	720	730	740	750
AGACAGTTTC	AAAAGGATAG	AATTGTATCG	AAAAGAGCAC	TCTGATAAAT
760	770	780	790	800
CTCAGCCAGA	ACATAATGGA	GAAAAACAAAT	TGTAACAAAA	ATTACAGCCC
810	820	830	840	850

TCTATTTGCA TTTGTCCTTT CACAAAGGAC CATCGAGCCA CAAAGCCAAG
 860 870 880 890 900
 GGCCGAAAGC CAGAATAATA ACAACTGGCA GCCAAAACGG CAACAAAGAC
 910 920 930 940 950
 CAGCATCATC AGCATAAAAG TCGAGACTTT TGACTCACAA TCGCTACATC
 960 970 980 990 1000
 GAATGGCTGT CGAC
 1010

Y22Fb

AAGCTTTTTG CCATTATTTTC ACTTGAATCT GCTTTTTTGCC GAGTACTTGA
 10 20 30 40 50
 ACTAATTTTG ATAAGCTGGC GAAATTTTAA ATTGACACCT GAGCTGCTAT
 60 70 80 90 100
 CACCTTCGAT AGCTCAGTTG GTAGAGCGGT GGACTGTAGA AGTTTTCAGA
 110 120 130 140 150
 TCTGATCACA CTTTCCAGGT GATCGAATCC AGCAGGCATC CATAGGTCGC
 160 170 180 190 200
 TGGTTCAAAT CCGGCTCGAA GGATAACTTT TTTTTCATA TATATGTATA
 210 220 230 240 250
 CCATATACTT TTCTTTTATC CCTCACCAGT AATCCGTAGT AAATAAAGAC
 260 270 280 290 300
 CATTGATATAT ATATTTTTTTT TTTAATAAAT TGTTTTCTTT TATATTTTTT
 310 320 330 340 350
 ATCTTTCTTT TCATCCTTGC TCCTGCATCA TCGTCGTCGT CCTCAAAAAT
 360 370 380 390 400
 ACGGGTTGTT TTAAATAAAT AAAATAATAA TGTTTATATG ACAAACCTGCA
 410 420 430 440 450
 TATACGAGAC GTGCGCTGCA ACATCAGGCA CGAATCGATA TTTTCCATTT
 460 470 480 490 500
 ATCGGGTTTT CTTTTTGTGG GGTTTTTTCT CTTTTCTCTC GTTTCTATTA
 510 520 530 540 550
 ATTTATCCAA CATGCT
 560

beiden Introns der 22F tRNA^{Tyr} Gene (Oli 4 und Oli 6; siehe M13 Techniken: Oligonukleotide).

Zwanzig positive Klone wurden isoliert. Southern-Analysen mit 3 verschiedenen Restriktionsenzymen ergaben erste Hinweise darauf, welche Klone die 22F Gene tragen. Weitere Informationen ergaben die Verdauung und die Sequenzanalyse von subklonierten Fragmenten. Zehn Klone enthielten beide bekannten 22F Gene (λ 4, 9, 42, 47, 49, 68, 69, 72, 77, 95). In 3 Klonen war das 22Fa Gen allein vorhanden (λ 59, 116, 118), in einem nur das Gen 22Fb (λ 5). Fünf Klone zeigten einen neuen Inserttypus (λ 7, welcher später λ Y85Aabc genannt wird, λ 43, 57, 112, 113) und 1 weiterer Klon zeigte wieder einen neuen Inserttypus (λ 114, später λ Y28C).

Die genomische Lokalisation der tRNA^{Tyr} Gene wurde mittels "in situ" Hybridisierung an die Speicheldrüsen Chromosomen von *Drosophila* Larven bestimmt. Als Proben dienten 5'-[³⁵S]dATP (>1000Ci/mmole; Amersham SJ 1304) markierte, nick-translierte Proben und M13 Proben dieser tRNA^{Tyr} Gene. λ 7 hybridisiert in der Region 85A, λ 114 bei 28C (Abb. 6). Da eine Probe verwendet wurde, die ein tRNA^{Tyr} Gen enthält, sind je nach Hybridisierungsbedingungen die anderen tRNA^{Tyr} Loci auch sichtbar. Starke Signale entstanden in den folgenden Regionen: 22F, 28C und 85A. Sehr schwache Signale traten z.T. auch bei 19F auf (mit 85A Proben). Der Klon Y85Ade hybridisiert ebenfalls an den Locus 85A (M. Hoffmann, pers. Mitteilung und eigene Resultate, nicht gezeigt). Bei zwei Präparaten konnten in der Region 85A zwei markierte Banden beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass zwei verschiedene tRNA^{Tyr} Genclusters (oder Gene) in der Region 85A vorhanden sind. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die beiden Phagentypen aus 85A auch ein unterschiedliches Restriktionsmuster zeigen.

Aus Einzelverdauungen und Doppelverdauungen mit verschiedenen Restriktionsenzymen wurde für die drei verschiedenen λ Phagen Y28C, Y85Aabc und Y85Ade eine Restriktionskarte erstellt. Die folgenden Abbildungen 7-9 zeigen diese jeweils unter a). Die Feinstruktur derjenigen Fragmente, die tRNA^{Tyr} Gene enthalten, ist in b) so gezeigt, wie sie aus der Sequenzanalyse hervorgeht. Die Sequenz der jeweiligen Fragmente ist in c) wiedergegeben. Als Strategie für die Sequenzanalyse der verschiedenen tRNA^{Tyr} Gene wurde gezieltes Klonieren in M13 und

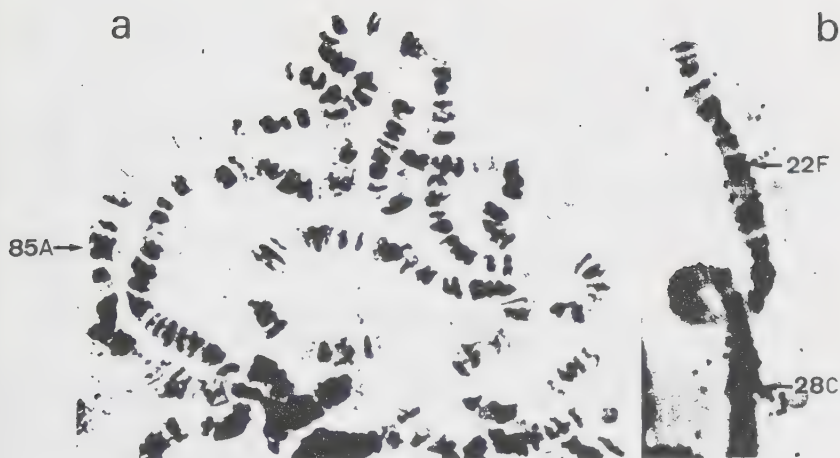


Abb. 6:

In situ Hybridisierung von [^{35}S] markierten tRNA^{Tyr} Genen an die Speicheldrüsen Chromosomen von *Drosophila melanogaster*. Die Regionen mit Signalen sind mit einem Pfeil bezeichnet. Es wurden die folgenden Hybridisierungsproben verwendet:

- a: Nick-translierte Probe, die das 1,8 kb EcoR 1 Fragment mit den Genen Y85Aabc enthält (Abb. 7).
- b: Einzelstrang M-13 Probe, die das Dra III - Hind III Fragment mit dem tRNA Gen Y28C enthält (Abb. 9).

das Erstellen von Nuklease Bal 31 Deletionen gewählt. Neben dem universellen Primer konnten auch das ochre- und das Tyr-Oligonukleotid verwendet werden.

$\lambda\text{Y85Aabc}$ (Abbildung 7) enthält 3 tRNA^{Tyr} Gene, die knapp 400 bp voneinander entfernt von demselben Strang codiert sind (also in dieselbe Richtung transkribiert werden können). Ihre Intronsequenzen sind nahezu gleich und entfernt verwandt mit derjenigen von Y22Fa (siehe Abb. 10).

λY85Ade (Abbildung 8) enthält zwei tRNA^{Tyr} Gene. Sie sind von demselben Strang codiert und von knapp 300 Basenpaaren getrennt. Ihre Introns sind denjenigen von 85Aabc in Länge und Sequenz sehr ähnlich. Der Klon λY28C (Abbildung 9) enthält ein tRNA^{Tyr} Gen, das ein Intron von 113 Basenpaaren aufweist.

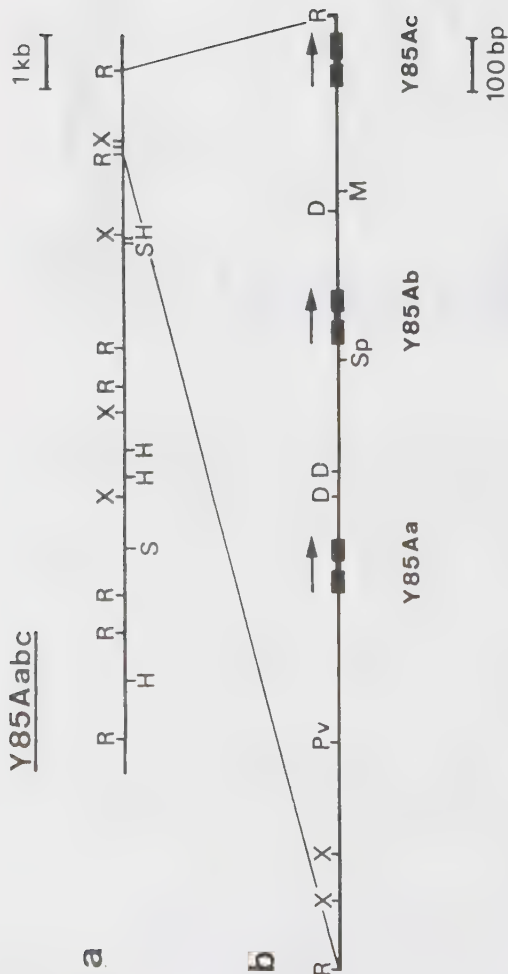


Abb. 7:
Struktur der Region Y85Aabc

D: Dra I
X: Xho I

hi: Restriktionskarte des λ Phagen

Feinstruktur des 1,8 kb EcoR I Restriktionsfragmentes wie sie aus der Sequenzanalyse (c) hervorgeht. Sequenzen, die für tRNA^{Asp} codieren sind als ausgefüllte Flächen eingezeichnet, die Introns als dick ausgezogene Linie. Die drei tRNA^{Asp} Gene sind bezeichnet als Y85Aa, Y85Ab und Y85Ac. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (folgende Seiten): Sequenz des 1,8 kb EcoR I Fragmentes. Es ist der nicht codierende Strang der tRNA Gene angegeben. Unterstrichen ist jeweils die Sequenz vom 5' Ende des Gens bis zum 3' Ende (inkl. Intron). Die Sequenz homolog zur reifen tRNA ist schräggestellt.

Y85Aabc

GAATTCGCAG	TTTCTGGGCC	AGATCTTTCA	GATCCTGGAC	GGTCTTAGCT
10	20	30	40	50
TCGGGCTTGT	GGTACGACAT	CTTTGAAATG	CGAATGTAAA	TTGGATCCGA
60	70	80	90	100
ACAAATGCGG	TTTTTGATAT	GTTGCACAAC	AAAACCTGAG	AGTTTCGGAT
110	120	130	140	150
TCGTTAGCCA	AAGGGTGACT	CCTCTATGTT	TGCAATAGAC	AGACAAGAGT
160	170	180	190	200
ATCGACGTGG	TGGATAAGTA	GCTCGAGTCG	GAGTTATCAA	CGGACCACTG
210	220	230	240	250
CTGCCGGCTT	CTGGGAACGA	ACTGCTCTCG	TCGCCGGCAC	TTCCGGTCGCT
260	270	280	290	300
TTTACGCTGT	GGGGGCTCAA	TCTTGGGAGC	GGACTCGCAA	AGTATCGGTA
310	320	330	340	350
TCGTCTATCG	TCGGCGCTGG	AACGAGATGG	ATATATGTAT	AAATATGGCA
360	370	380	390	400
TCTTTACTCG	CACACCACCC	CTTTATCGGT	GCACAGCTGT	CGGTGGGTAA
410	420	430	440	450
CTAGTTAGTT	TCAAATAGTG	CATTGCTGCC	TTTCTAAATT	CATGCACAAT
460	470	480	490	500
TTTGGTCTAA	AATTAAGCCA	TGAACAGTTG	TACCTGAATA	TTTTCTCATT
510	520	530	540	550
AAGATTTACA	ATGCTTTAGT	ATTTAATATA	AGTTTACAAG	AATTTAAGGT
560	570	580	590	600
CCTATTTTTT	TGGCCGCGAG	TATTTAAAGAG	CAGCGGTGTT	TAAGAGAAGT
610	620	630	640	650
GCCCTCTCTT	TTTGTCACTT	TCCCCACCTC	GCTCCTGAAC	AAAAGGTGAA
660	670	680	690	700
TTAGCCGCAA	GCGAATTTAA	<u>CCTTCGATAG</u>	<u>CTCAGTTGGT</u>	<u>AGAGCGGTGG</u>
710	720	730	740	750
<u>ACTGTAGTTG</u>	<u>GAAAAACATG</u>	<u>CAATAGAAAT</u>	<u>CCATAGGTGG</u>	<u>CTGGTTCAAA</u>
760	770	780	790	800
<u>TCCGGCTCGA</u>	<u>AGGATCGAAA</u>	<u>AGATATAAAT</u>	<u>ACCTTTTTTT</u>	<u>TATATATTTT</u>
810	820	830	840	850
GTACTGCACA	TACCTTTTTT	TTATATATTT	TGTAGTGCAC	AATTTAAATC
860	870	880	890	900

AATTTAATTC 910	ATCTACAGAC 920	ATTCAGAATA 930	TAACTGAGCT 940	GTTTAAACTA 950
AATAATATAA 960	GAAGGATTTT 970	ATTTGGAAGA 980	AATAAACCGT 990	AACTAAATTG 1000
ATATAGTTTG 1010	TGAAAAGCGC 1020	CTAGGCTATT 1030	AGGCTTGGA 1040	ACTATAGGCT 1050
TACTGCAATG 1060	GACTGAATAG 1070	AGAAAGTTGA 1080	TCAATTTTGT 1090	TTGACCTAAA 1100
TAAGTAAAAA 1110	TCAAAAATAA 1120	ATAACCAAAT 1130	ACGGTGCATT 1140	TCGTTTGTGC 1150
GCATGCATAA 1160	AACGAACAAC 1170	GGCCAAGTTT 1180	GAACTCAACC 1190	<i>TTCGATAGCT</i> 1200
<i>CAGTTGGTAG</i> 1210	<i>AGCGGTGGAC</i> 1220	<i>TGTAGTTGGA</i> 1230	<i>AAATTATGCA</i> 1240	<i>ATAGAAATCC</i> 1250
<i>ATAGGTCGCT</i> 1260	<i>GGTTCAAATC</i> 1270	<i>CGGCTCGAAG</i> 1280	<i>GATTTTTTGT</i> 1290	<i>AATATCCAAT</i> 1300
TCGTTTTTGT 1310	TTTTATAGTA 1320	GCACCCGTAC 1330	CCCATAAAAA 1340	ATATATAAAA 1350
TAGTATGCAA 1360	TTATAAACAT 1370	GTAGATGCAA 1380	AAGACATTTT 1390	ATAAACACAA 1400
TGTTATATAA 1410	AATGAATAAT 1420	AATTTGAAGA 1430	ATATCAATTT 1440	TAAAAACACG 1450
TGAAAAATGAA 1460	CATGTCTTAC 1470	TTTACGCGTA 1480	CATCAATATA 1490	TTATTTAATT 1500
TTAGCTTAGC 1510	AACAATCAAA 1520	AGAAAAGGTA 1530	TTTGAACGAC 1540	ATGGCATATG 1550
CTGTCCGTGA 1560	CCTCAATCCA 1570	TTAAAAGCTA 1580	AAATACGCAT 1590	TAATTAAACC 1600
GATTACCAAC 1610	AAAAGTTTTAT 1620	TGAAGAGTCG 1630	CGATGAATCG 1640	GATACCCGTT 1650
GTTTAACTTA 1660	CTCCCCAGCA 1670	CGCCCCCTTC 1680	<i>GATAGCTCAG</i> 1690	<i>TTGGTAGAGC</i> 1700
<i>GGTGGACTGT</i> 1710	<i>AGTTGGAAAA</i> 1720	<i>CATGCAATAG</i> 1730	<i>AAATCCATAG</i> 1740	<i>GTCGCTGGTT</i> 1750
<i>CAAATCCGGC</i> 1760	<i>TCGAAGGATT</i> 1770	<i>TTTTGTGCAA</i> 1780	<i>TTTTTTACAA</i> 1790	<i>GCCATTTTTA</i> 1800
ATGCATTCTT 1810	GAATTC			

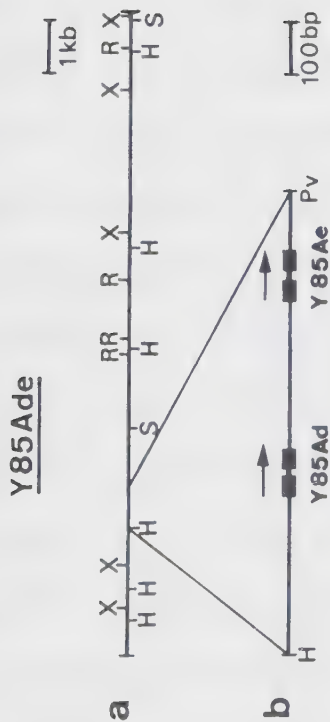


Abb. 8:

Struktur der Region Y85Ade

H: Hind III Pv: Pvu II R: EcoR I S: Sal I X: Xho I

a: Restriktionskarte des λ Phagen

b: Feinstruktur des 0,9 kb Hind III - Pvu II Restriktionsfragmentes wie sie aus der Sequenzanalyse (c) hervorgeht. Sequenzen, die für tRNA^{tyr} codieren sind als ausgefüllte Flächen eingezeichnet, die Introns als dick ausgezogene Linie. Die zwei tRNA^{tyr} Gene sind bezeichnet als Y85Ad und Y85Ae. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an.

c: (folgende Seite) Sequenz des 0,9 kb Hind III - Pvu II Fragmentes. Es ist der nicht codierende Strang der tRNA Gene angegeben. Unterstrichen ist jeweils die Sequenz vom 5' Ende des Gens bis zum 3' Ende (inkl. Intron). Die Sequenz homolog zur reifen tRNA ist schräggestellt.

Y85Ade

AAGCTTTAAA	AAGAGTTAAA	GCAAGTCAGA	AATATACAAT	CTTTCTAAAA
10	20	30	40	50
TGTGTGGCAA	AAATTGATGA	AAACGGGATT	TTAACGGATT	AAAAAGCATT
60	70	80	90	100
TCTTTAGAAG	TACATTAAAA	AATTACACAA	AGATAAAGTA	ATTTACTGAT
110	120	130	140	150
CCAATTAAAT	TAATTCCCGG	TTGTGGTGCG	CCTTATTTAT	AAACTTGTTG
160	170	180	190	200
CTTATCAAGA	TATTACGTCA	TTAGTTGAGA	TCGAAGTGGT	TTCTTCAGAC
210	220	230	240	250
ATTTCTCTCG	CTCGCACATA	TGTACAAAAC	TTACATTGGC	CACCCGAGAT
260	270	280	290	300
TCAAACTTC	GATAGCTCAG	TTGGTAGAGC	GGTGGACTGT	AGTTGGAAAA
310	320	330	340	350
CAAGCAATAG	AAATCCATAG	GTCGCTGGTT	CAAATCCGGC	TCGAAGGATT
360	370	380	390	400
TTTTGTTATT	TTAATTTTTT	TTTTTAAATT	TAGTAATTAC	TTAAAAACG
410	420	430	440	450
AATGGATACC	ATTAAACGAA	ATAAAATATG	TATTTAATTT	AAGTTAGCAA
460	470	480	490	500
CTATTTTAAT	CGTAGGTGCG	TCTCATTATT	GTAAAAACCA	AATGCTCCCC
510	520	530	540	550
AAAAACCAGA	TTTGGGGAGC	TGATAAGCAA	ATTTAGCTGA	CCACGAAATT
560	570	580	590	600
TGTTCGAACG	AGTGCGAGTG	AATGAGTATG	AGTGCGAAAG	CAAATGAATC
610	620	630	640	650
CCCCCAACTA	AGCCCCCAC	CAACCTTCGA	TAGCTCAGTT	GGTAGAGCGG
660	670	680	690	700
TGGACTGTAG	TTGGCAAACA	AGCAATAGAA	ATCCATAGGT	CGCTGGTTCA
710	720	730	740	750
AATCCGGCTC	GAAGGATTTT	TTTTTCAGTT	ATATTTTTTT	TATTGAATTT
760	770	780	790	800
AGGCACGTTT	TAAAAGTGAA	AGTGCCCAT	ATGAAAGTGT	GATGCGAAAG
810	820	830	840	850
TCGAGTGGA	ATATAAGCTG	CTGGTCAGCT	G	
860	870	880		

Y28C

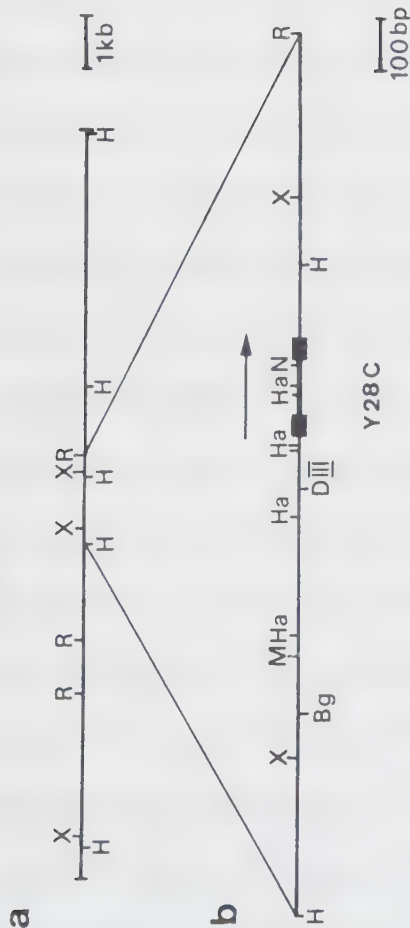


Abb. 9:

Struktur der Region Y28C

Bg: Bgl II DIII: Dra II Ha: Hae III H: Hind III M: Mlu I N: Nru I R: EcoR I
X: Xho I

a: Restriktionskarte des λ Phagen

b: Feinstruktur eines Fragmentes, welches das $tRNA^{Tyr}$ Gen enthält, wie sie aus der Sequenzanalyse (c) hervorgeht. Die codierenden Sequenzen sind als ausgefüllte Flächen eingezeichnet, die Introns als dick ausgezogene Linie. Das $tRNA^{Tyr}$ Gen ist als Y28C bezeichnet. Der Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung an.

c: (folgende Seiten): Sequenz des $tRNA^{Tyr}$ Gens und flankierender Regionen. Es ist der nicht codierende Strang angegeben. Unterstrichen ist die Sequenz vom 5' Ende des Gens bis zum 3' Ende (inkl. Intron). Die Sequenz homolog zur reifen tRNA ist schräggestellt.

Y28C

AAGCTTTAAC	AACACCCACT	CACATAGTCC	CTAAGCTAGC	CTAATGAATG
10	20	30	40	50
CCGTGAACTA	AACCTGATCT	AAGTACATCT	AACGATGCTA	AAGTGTTGCC
60	70	80	90	100
AATAAAGTGT	TATAACGTTT	ACTAAAACCA	GAGCGCAATG	TTTGAATTGG
110	120	130	140	150
GAAAAATCAA	GCTATGAAAA	TCCTTACTTT	GTTTTCTATC	GATATATTTA
160	170	180	190	200
TGTGAAACAT	TACGTAAAGT	TACATTTCTT	TTGACAAGTG	TATTATTTAC
210	220	230	240	250
CTTTTCATAT	GCATTTGCCA	GGTGTA AAC	TCATACGCTC	TGTTGTA CTC
260	270	280	290	300
GAGTGCTTTA	AACTTGACAG	AAACAACTC	ATGTTCACTC	GCTCGTTTAT
310	320	330	340	350
TTTTGACAGC	ATCAAATAAA	AAGTGTA AAA	ATAGATCTAT	TATTTCTCAA
360	370	380	390	400
ATCCCTGTTG	GCTTTAGTTC	AGTATGGTAA	ATTGGAAGTT	CAGGCTTGAG
410	420	430	440	450
TGACAATGGC	GAATAATCAG	CCCCGACAA	CGAATGCTAC	GCGTAAAGAT
460	470	480	490	500
AAGCGCATAG	AGCGGGACGA	GAACCGTGGC	CAATGGAAGA	GCAAGTCGGA
510	520	530	540	550
GTTTATCCTC	TCGCTCCTTG	GATATGCCAT	TGGCATTGGC	AATGTGTGGC
560	570	580	590	600
GATTTCCCTA	TCTCTGCTAC	CGCAGTGGCG	GCGGTAAGTC	ACCATTAATT
610	620	630	640	650
CGCCACATA	GCCACCTGTT	CACCCACCTG	AGACAACCGA	ACCAACCGAA
660	670	680	690	700
CCAACAACCA	CCCACCCATC	TCGTCCAGCA	TATCCATGGG	TGAGCTCAAG
710	720	730	740	750
CTCTGGCCGC	TCCCGAAATA	GCGCAGCACT	GACGTCAGTA	CTGAACGAGA
760	770	780	790	800
GTTCTGCACT	GAGTGGCGAT	GTTTATTTTT	AGGCTTTAGC	TTTCGAGTGA
810	820	830	840	850

AAGCTGGCAA	AGCTCCAGCA	CACTTGAGGG	CCATT'TGGCC	GACCAAATAG
860	870	880	890	900
CGACG <u>CC</u> TTT	GATAGCTCAG	TTGGTAGAGC	GGTGGACTGT	AGAGT'TTCCG
910	920	930	940	950
AGGCTTGGTG	ATGCGAGCAG	AGGCAGGACT	CTGGGCCAAA	CAATACCATG
960	970	980	990	1000
GCCCCAGATA	GCGCTTGCTC	TTGTTTCATC	AGTTAGTGAA	TCGCGATATG
1010	1020	1030	1040	1050
TTGAAATCCA	TAGGTCGCTG	GTTCAAATCC	GGCTCGAAGG	ATATTATTTT
1060	1070	1080	1090	1100
GGGTTTTCTT	CCGTTTTCTT	TGTCGGTTTC	TTTCTCTAAA	AACTCTTGTT
1110	1120	1130	1140	1150
TATCTGACCA	ATTGAAGTGT	ATCGAGAAAA	CCTGTAAATC	GTTTAATGAG
1160	1170	1180	1190	1200
ATGTAGATGT	AGATTTGTGA	AAATGTGTAT	TTAAGCTTTT	TACATTAGTA
1210	1220	1230	1240	1250
CATGACTTTT	CTCCTTTTTT	TTAGCCGCCT	TTCTGATTCC	CTACCTGTTG
1260	1270	1280	1290	1300
ATGGTAATTT	TAGCCGGCAT	ACCCCTGTTT	TATATGGAAG	TTCTGATCGG
1310	1320	1330	1340	1350
TCAGTTCTCG	AGCACCGGAT	GCACTGGCAT	GTTTCGCATG	ACGCCTCTGC
1360	1370	1380	1390	1400
TGAAGGGAAC	GGAATCGCT	CAGGTGGTGG	TCAATGCCTA	CTGCGTGTGC
1410	1420	1430	1440	1450
TACTACTCGG	TGATCATATC	GTATCCCATT	CGGATGATCT	TCTACTGTTT
1460	1470	1480	1490	1500
CTTCAAGAAG	GTGCCCTGGG	AGGACTGTTC	CAATTTCATG	AATACCGACG
1510	1520	1530	1540	1550
ACTGTGTAAC	CGCGTCTGAC	GTAAGCATAC	TTATTACAAT	AAGCATATGT
1560	1570	1580	1590	1600
ATAAAATCAGT	ATTTTCGATT	CTTAGATGGG	AAAGCAAAAT	AGTAGTGATG
1610	1620	1630	1640	1650
TGTTCAAAAC	TTCCGCCGAT	GAATTC		
1660	1670			

Die codierenden Sequenzen aller Gene sind identisch und entsprechen der Sequenz der reifen tRNA^{Tyr}, wie sie in dieser Arbeit beschrieben ist. Die codierende Sequenz ist in allen Genen von einem Intron unterbrochen. Diese sind für die fünf 85A Gene ähnlich, sonst aber sehr schwach oder gar nicht homolog. Abbildung 10 zeigt eine Zusammenstellung dieser Intronsequenzen.

Genomische Southern-Analysen mit M13 Proben und/oder nick-translierten Proben dieser Gene wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass diese Klone nicht durch Rekombination entstanden sind. Weiter sollten sie einen Hinweis darauf geben, ob alle tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* kloniert wurden, oder ob noch weitere existieren. Aus Abbildung 11 geht hervor, dass alle klonierten Genfragmente dieselbe Länge haben wie die entsprechenden genomischen Restriktionsfragmente. Eine EcoR 1 und eine Hind III Bande konnte keinem der klonierten Gene zugeordnet werden. Da Proben von verschiedenen tRNA^{Tyr} Genen an diese Bande hybridisieren, ist es möglich, dass 1 - 2 zusätzliche tRNA^{Tyr} Gene existieren, die identische oder nur ähnliche codierende Sequenzen tragen, wie die bisher bekannten Gene. Ein RPC-5 Profil von tRNA^{Tyr} von *Drosophila* zeigt

Abb. 10:

Intronsequenzen (nicht codierender Strang) der isolierten tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster*.

85Aa: TTGGAAAAACATGCAATAGAA

85Ab: TTGGAAAATTATGCAATAGAA

85Ac: TTGGAAAA CATGCAATAGAA

85Ad: TTGGAAAA CAAGCAATAGAA

85Ae: TTGGCAAA CAAGCAATAGAA

22Fa: ATTGGGATTACGAATGTAGAC

22Fb: AAGTTTTTCAGATCTGATCACACTTTCCAGGTGATCGAATCCAGCAGGC

28C: AGTTTCCGAGGCTTGGTGATGCGAGCAGAGGCAGGACTCTGGGCCAAACAATA
CCATGGCCCCAGATAGCGCTTGCTCTTGTTTCATCAGTTAGTGAATCGCGATA
TGTTGAA

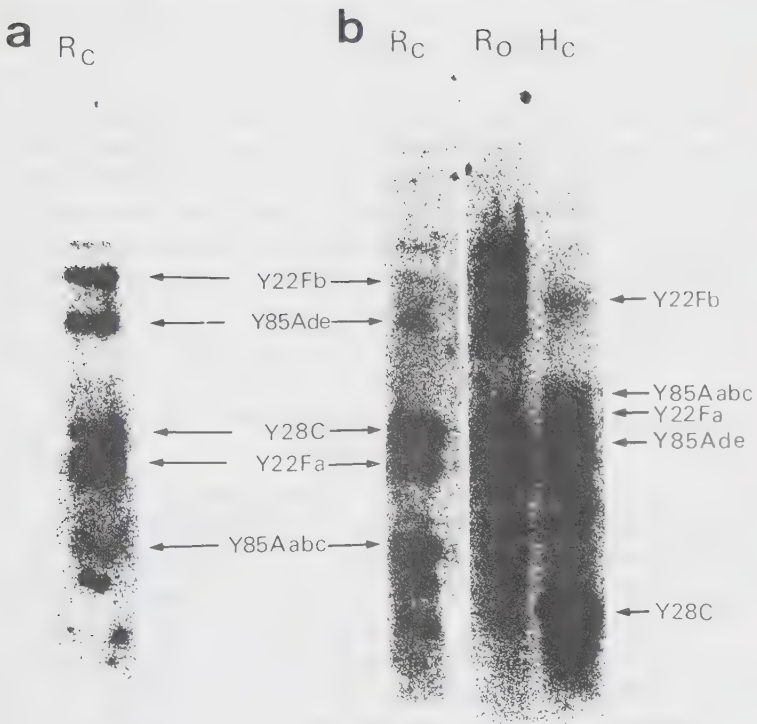


Abb. 11:
Genomische Southern-Analysen mit *Drosophila melanogaster* DNA und [^{32}P] markierter, einzelsträngiger M-13 Probe :

- EcoR I verdaute DNA von Canton S Embryonen (R_C) mit dem Acc I - Hind III Fragment des Gens Y22Fb als Probe (Abb 5b).
- EcoR I verdaute DNA von Oregon R Embryonen (R_O), EcoR I verdaute DNA von Canton S Embryonen (R_C) und Hind III verdaute DNA von Canton S Embryonen (H_C). Als Probe wurde das Hind III - Dra III Fragment des Gens Y28C verwendet (Abb. 9)

neben den beiden sequenzierten Hauptisoakzeptoren noch einen weiteren Isoakzeptor, der in viel späteren Fraktionen eluiert (M. Bienz, 1981). Dieser Isoakzeptor liegt in sehr niedriger Konzentration vor. Er könnte deshalb dem Produkt *eines* Genes entsprechen.

Es kann praktisch ausgeschlossen werden, dass im *Drosophila* Genom ein weiteres tRNA^{Tyr} Gen vorhanden ist, das gleiche codierende- und gleiche Intron-Sequenz aufweist, wie die beiden tRNA^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C. Denn Einzelstrang M13 Proben dieser beiden Gene mit nur wenig flankierenden Sequenzen hybridisieren nur schwach an die nicht identifizierte Bande. Dies ist eine Voraussetzung für die unten beschriebenen S₁-Mapping Experimente.

3. Funktion von Introns in tRNA^{Tyr} Genen

Johnson und Abelson (1983) konnten als Erste demonstrieren, dass ein Intron in einem Hefe Suppressor tRNA^{Tyr} Gen notwendig ist für die Suppressionsaktivität *in vivo*. Ein Gen, dem das Intron exakt entfernt wurde, produzierte wohl noch reife tRNA; diese war aber als Suppressor praktisch inaktiv. Diese Autoren zeigten, dass sich Gene mit und ohne Intron weder in der Transkriptionsrate noch im Processing wesentlich voneinander unterscheiden. Hingegen wird die Ψ -Modifikation in Position 35 bei der Mutante nicht gebildet. Das Fehlen dieser Modifikation ist der einzige Unterschied den sie finden konnten.

Wir wollten deshalb wissen, ob diese Modifikation auch in tRNA^{Tyr} Genen höherer Eukaryonten von der Präsenz eines Introns abhängig ist. Falls dies zutrifft, stellt sich die Frage, ob diese verschiedenen Introns die Information tragen, die für die Erkennung durch das Modifikationsenzym notwendig ist.

Mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotides wurde nach der *double primer* Methode von Zoller und Smith (1984; ausführlich beschrieben bei Carter et al., 1985, und R. Dörig, 1986) Mutanten der Gene Y22Fa (Y22Fa Δ I) und Y22Fb (Y22Fb Δ I) konstruiert, denen exakt das Intron im

tRNA^{Tyr} Gen fehlt. Die korrekte Elimination des Introns wurde durch Sequenzanalyse der codierenden und eines Teils der flankierenden Sequenzen bestätigt.

Die Ψ -Modifikation in Position 35 der tRNA^{Tyr} Transkripte dieser Gene lässt sich spezifisch verfolgen. Das Ψ in Position 35 ist das einzige, das auf der 3' Seite von einem pA gefolgt wird. Verwendet man bei der Synthese der tRNA als radioaktives Substrat 5'-[α -³²P]-ATP und verdaut die isolierte tRNA (oder Vorläufer-tRNA) vollständig mit RNase T₂, so lassen sich aufgrund der *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} Sequenz die folgenden Modifikationen spezifisch verfolgen: acp³U₂₀, Ψ ₃₅, m¹A₅₈ und je nach Spleiss-Mechanismus eventuell m¹G₃₇. Das Auftreten dieser Modifikationen wurde mittels Dünnschicht Chromatographie (S. Nishimura, 1979) nachgewiesen. Dieses Prinzip der "nearest neighbour" Markierung ist am Beispiel von *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} und 5'-[α -³²P]-ATP als radioaktives Substrat in Abbildung 12 dargestellt.

Besitzen alle verschiedenen Typen von tRNA^{Tyr} Introns die Information, die das Ψ -Modifikationsenzym für eine korrekte Modifizierung benötigt? Die Experimente dazu wurden wie folgt durchgeführt. Die verschiedenen, unten aufgeführten Gene wurden zusammen mit 5'-[α -³²P]-ATP in *Xenopus* Oocytenkerne injiziert. Die synthetisierten tRNAs und tRNA Vorläufer wurden extrahiert, auf einem Sequenziergel gereinigt und mit RNase T₂ verdaut. Die derart entstehenden Nukleotid-3'-Phosphate wurden auf Dünnschicht Chromatogrammen zweidimensional aufgetrennt. Detaillierte Angaben zur Methodik finden sich bei Choffat et al. (1987). Die folgenden Gene wurden getestet: von *Xenopus laevis*: Tyr D, Tyr C und Tyr C* (Gouilloud and Clarkson, 1986); von *Drosophila melanogaster*: Y22Fa, Y22Fb, Y85Ab, Y28C. Alle diese Gene werden in der *Xenopus* Oocyte transkribiert, und die Transkripte werden von der Ψ -Insertase als Substrat erkannt. Die Position 35 wird bei allen tRNA zu Ψ modifiziert. Beispiele von drei *Drosophila* Genen mit verschiedenen Introns sind in Abbildung 13a-c gezeigt.

Die korrekte Modifikation zu Ψ ₃₅ im *Xenopus* Oocytensystem ist von der

Präsenz des Introns in den tRNA^{Tyr} Genen abhängig. Dies konnte für drei verschiedene Gene von *Drosophila* und *Xenopus* gezeigt werden. Die Transkription der tRNA^{Tyr} Gene Y22Fa Δ I, Y22Fb Δ I (die beiden *Drosophila* Gene aus 22F, ohne Intron) und XLYC* Δ I (das *Xenopus* Gen C* ohne Intron) führt nicht zu dieser Ψ -Modifikation (Abb. 13d).

Aus den hier gezeigten Resultaten und aus den Experimenten von Johnson und Abelson (1983) und Nishikura und De Robertis (1981), lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

- 1) Die Introns in eukaryontischen tRNA^{Tyr} Genen sind für die richtige Modifizierung des Nukleotides in der Mitte des Anticodons notwendig. Die Ψ -Insertase (von Hefe und *Xenopus*) benötigt unbekannte Strukturen des tRNA^{Tyr} Vorläufers mit Intron.
- 2) Eine korrekte Ψ -Modifikation ist für die Translationsaktivität der Suppressor tRNA^{Tyr} von Hefe notwendig (Johnson und Abelson, 1983). Möglicherweise ist diese Modifikation auch für die Translationsaktivität der Wildtyp tRNA^{Tyr} notwendig.
- 3) Es gibt verschiedene Typen von Introns in tRNA^{Tyr} Genen, die alle die notwendige Information für die Erkennung durch die Ψ -Synthase enthalten.
- 4) Die Modifikation ist nicht direkt mit dem Spleissen gekoppelt, da schon ein Vorläufer mit Intron die Ψ -Modifikation trägt (Nishikura and De Robertis, 1981; Y. Choffat, pers. Mitteilung).

Es wurde deshalb nach Primär- und Sekundärstrukturen gesucht, die allen hier getesteten Genen gemeinsam sind. Solche könnten von der Ψ -Synthase erkannt werden.

Für diese Suche wurden die folgenden Computerprogramme verwendet: Queen und Korn (1980), R. Staden (1978) und Zucker und Stiegler (1981; enthalten im "Sequence analysis software package of the University of Wisconsin Genetics computer group").

Da keine genügend spezifischen Konsensussequenzen existieren, wurden Sekundärstruktur Analysen durchgeführt. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass schon Vorläufer-tRNAs die Struktur der reifen tRNA einnehmen (Guthrie and Abelson, 1982; Swerdlow and Guthrie, 1984). Das

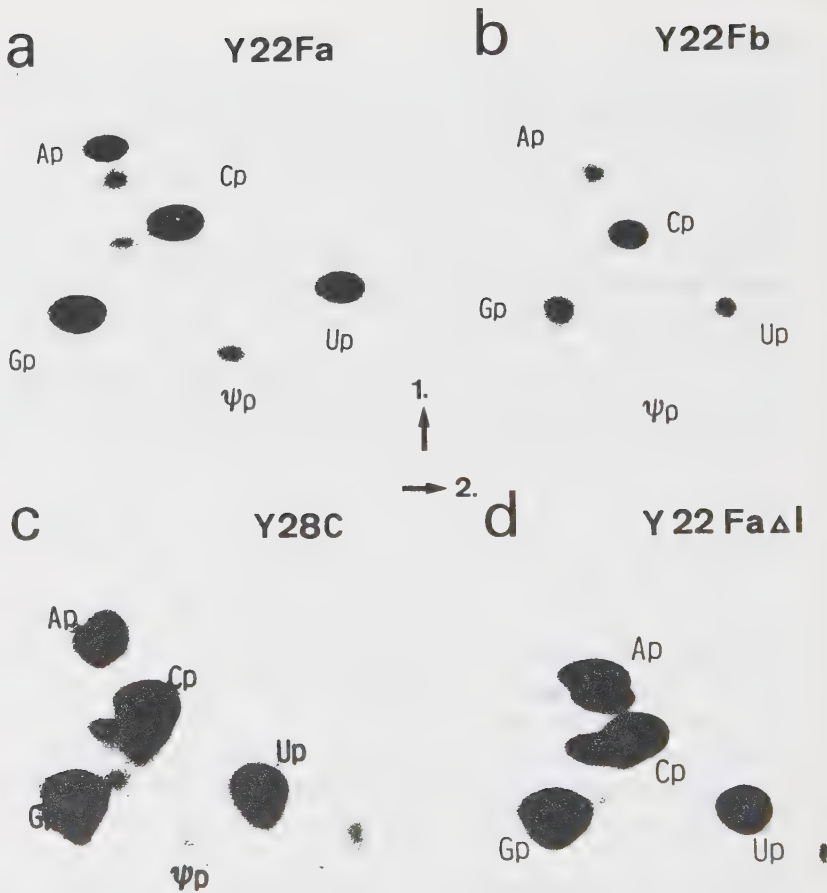


Abb. 13:

Basenanalyse der Transkripte von verschiedenen $tRNA^{Tyr}$ Genen von *Drosophila melanogaster* in der *Xenopus* Oocyte. Es wurde mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ markiert. Die tRNA wurde über ein Sequenziergel gereinigt und mit RNase T₂ verdaut. Die Auftrennung der Mononukleotid-3'-Phosphate erfolgte nach S. Nishimura (1979) in der ersten (1.) und in der zweiten (2.) Dimension.

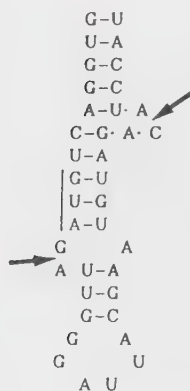
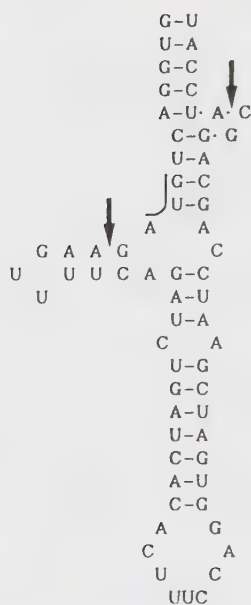
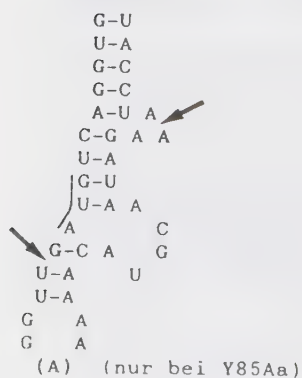
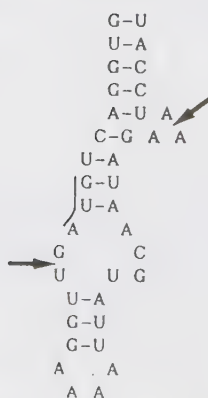
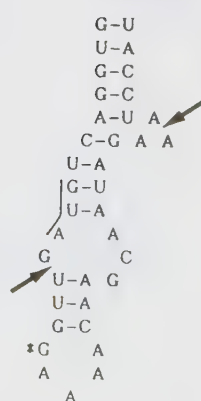
- Die Transkription des Gens Y22Fa führt zu einer tRNA, die in Position 35 zu Pseudo-Uridin modifiziert wird.
- Transkription des Gens Y22Fb. Das Pseudo-Uridin in der Position 35 ist vorhanden.
- Die Transkription des Gens Y28C führt zur Pseudo-Uridin-Modifikation in Position 35.
- Die Transkription des Gens Y22Fa ohne Intron (Y22Fa Δ I) führt zum Fehlen der Pseudo-Uridin Modifikation in Position 35.

heisst, dass alle vier tRNA-Stämme bereits ausgebildet sind. Deshalb wurde für die Sekundärstruktur Analyse mit den Stamm-Loop Analysen Programmen (Queen and Korn, 1980; R. Staden, 1978) nur jeweils die Sequenzen von Anticodonloop und Intron verwendet. Die Resultate der Stamm-Loop Analysen sind in Abbildung 14a dargestellt. Nach diesen Modellen ist es möglich, dass alle tRNA^{tyr} Vorläufer mindestens zwei Basenpaarungen zwischen Intron und Anticodon eingehen können. Das Programm von Zucker und Stiegler (1981) erlaubt die Faltung von RNA Sequenzen in ihre energetisch günstigste Sekundärstruktur. Mit diesem Programm wurden Vorläufer-RNA analysiert, die zusätzlich den Anticodonstamm enthielten. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 14b gezeigt. Weiter wurde auch geprüft, ob dieses Programm die 5' und 3' "prozessierten" Vorläufer-tRNA so faltet, dass die Struktur der reifen tRNA bereits darin enthalten ist. Eine andere Sekundärstruktur im Bereich der reifen tRNA wurde bei Y28C und Y85Ad Sequenzen gefunden, wobei Y85Ab nicht untersucht wurde. Die Sekundärstruktur dieser beiden Sequenzen ist in Abbildung 14c gezeigt.

Abb. 14 (folgende Seiten):

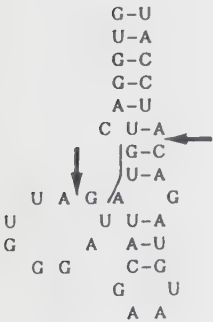
Sekundärstruktur Modelle der verschiedenen tRNA^{tyr} Vorläufer von *Drosophila melanogaster*. Das Anticodon ist eingezeichnet und die Pfeile markieren die vermuteten Spleissstellen.

- a) Stamm-Loop Analysen auf der Basis von Programmen von Queen and Korn (1980) und R. Staden (1978). Die Analysen wurden mit der Sequenz von Anticodonloop und Intron durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die möglichen Sekundärstrukturen von Anticodonstamm, -loop und Intron. Y28C wurde nicht untersucht.
- b) Sekundärstruktur Modelle nach dem Faltungsprogramm von Zucker und Stiegler (1981). Die Faltung erfolgte mit den Anticodonstamm, -loop und Intronsequenzen. Y85Ab wurde nicht untersucht.
- c) Die ganze Vorläufer tRNA^{tyr} wurde mit dem Programm von Zucker und Stiegler (1981) gefaltet. Dargestellt sind nur Y28C und Y85Ad, da nur diese eine Struktur ergeben, in der die reife tRNA nicht enthalten ist. Y85Ab wurde nicht getestet.

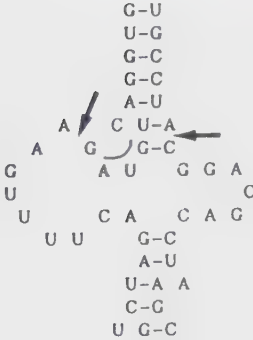
Y22FaY22FbY85Aa/cY85AbY85Ad/e

*G: C bei Y85Ae

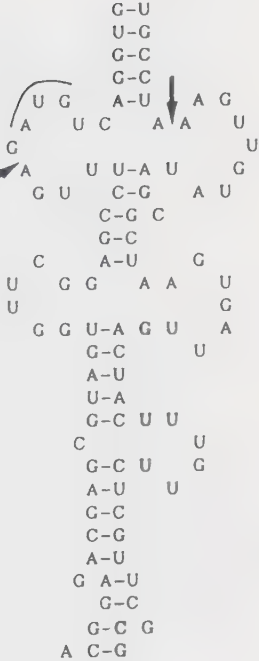
Y22Fa



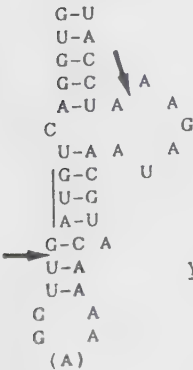
Y22Fb



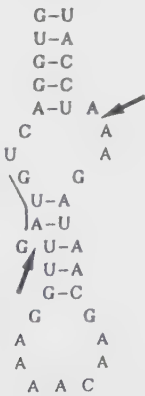
Y28C



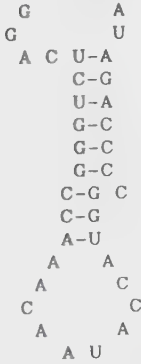
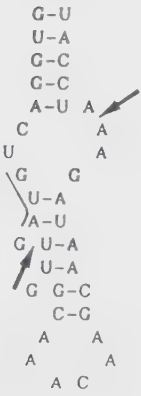
Y85Aa/c



Y85Ad



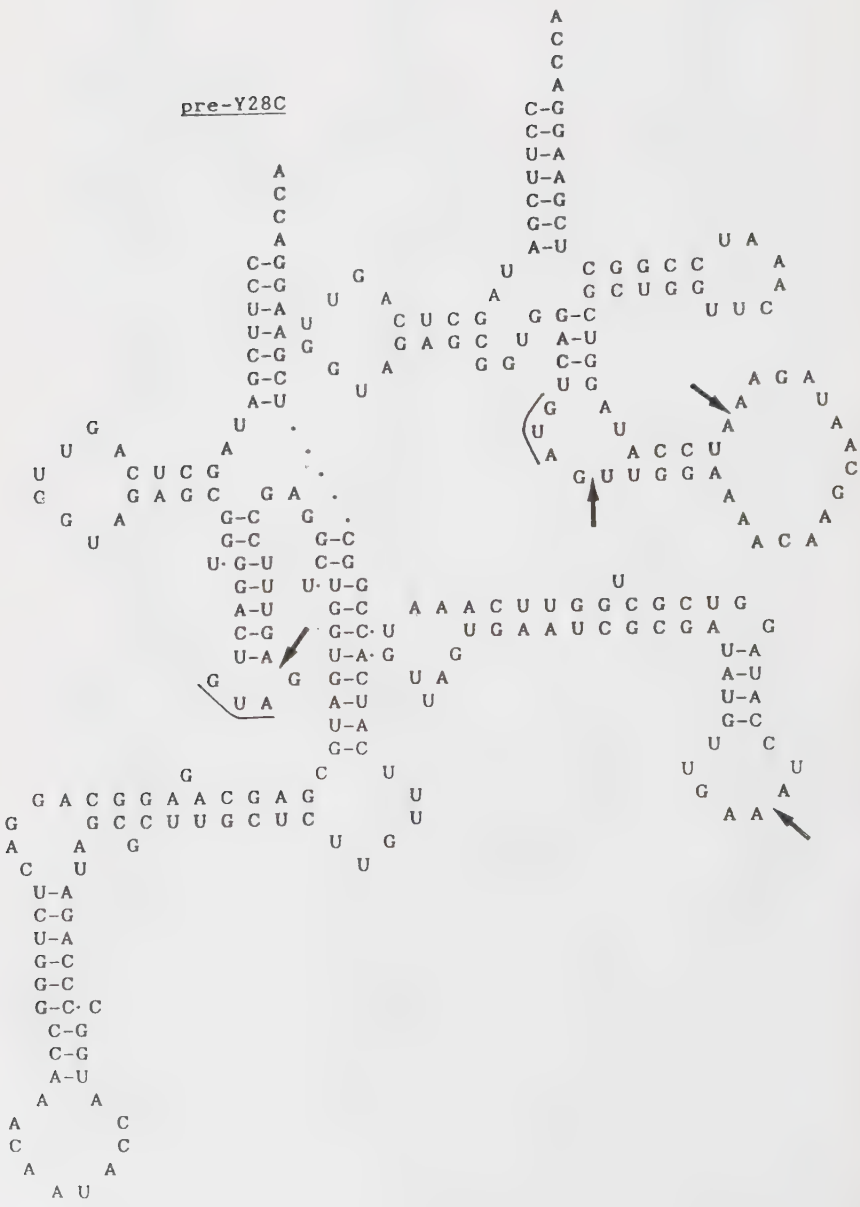
Y85Ae



(nur bei Y85Aa)

pre-Y85Ad

pre-Y28C



4. Expression der tRNA^{Tyr} Gene in *Drosophila*

Die ungewöhnlichen Intronstrukturen der tRNA^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C werfen die Frage auf, ob diese Gene auch in *Drosophila* exprimiert werden. Die genomische Verteilung der tRNA^{Tyr} Gene mit den verschiedenen Introntypen und ihre Lokalisation in der Nähe entwicklungsbiologisch interessanter Loci legen die Vermutung nahe, dass mindestens ein Teil dieser Gene während der Entwicklung unterschiedlich exprimiert wird. Experimente zu diesen beiden Fragestellungen werden in diesem Abschnitt besprochen.

Obwohl möglicherweise nicht alle tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* kloniert wurden, enthalten die beiden Gene Y22Fb und Y28C vermutlich ein singuläres Intron. In genomischen Southern-Analysen liess sich mit einer M13 Probe, die je eines dieser Gene und nur wenig flankierende Sequenzen enthielt, keine vergleichbar starke Bande markieren (Abb. 11). Die relativ langen, singulären Intronsequenzen ermöglichen es deshalb, diese Vorläufer oder die Introns mittels S₁-Mapping zu verfolgen. Zunächst wurde die benötigte Konzentration an Nuklease S₁ ermittelt. Als Kontroll-RNA diente ein Gemisch von 2 - 5 µg *E. coli* rRNA (Böhringer) und reife *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr}. Es zeigte sich, dass bereits 30 U pro Ansatz genügten, um eine M13 Einzelstrang Probe des Gens Y22Fb von den Enden her bis zu den codierenden Sequenzen zu verdauen. Unter diesen Bedingungen wird aber in der Intronsequenz der radioaktiven Probe *nicht* geschnitten. Dies hat vermutlich zwei Gründe. 1) Die Exonuklease Aktivität der Nuklease S₁ ist grösser als die Endonuklease Aktivität. 2) Die Intronsequenz bildet Sekundärstrukturen aus (Abb. 14). Dies führt zu einer Reduktion möglicher Angriffspunkte für die einzelstrang spezifische Nuklease. Für 2 - 5 µg RNA wurden 500 - 1000 U Nuklease S₁ benötigt. Nur so konnte eine komplette Verdauung derjenigen DNA Sequenzen erreicht werden, die nicht vollständig gepaart vorliegen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zum Studium der Expression der tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* wurde Kern-RNA aus vier verschiedenen Embryonalstadien, vier Larvenstadien, frühen und späten Puppen und aus adulten Tieren verwendet. Die adulten Tiere wurden noch fraktioniert in Extremitäten-,

Kopf- und Rumpf-Fraktion. Letztere bestand aus Thorax und Abdomen. Radioaktive einzelsträngige M13 Proben der Gene Y22Fb und Y28C wurden synthetisiert und an die einzelnen Kern-RNA Proben hybridisiert. Nuklease S₁ resistente Fragmente wurden für die Auftrennung auf einem Sequenziergel aufbereitet und das Sequenziergel nach beendeter Elektrophorese fixiert, getrocknet und exponiert. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

Nachweis der Expression der tRNA^{Tyr} Gene Y28C und Y22Fb

Für die Versuche mit dem Gen Y28C wurden je 2 µg Kern-RNA eingesetzt (Abb. 15a). Es wurde eine Probe gewählt, die nahe am 3' Ende des Introns (Nru I, Abb. 9b) beginnt und neben Intron Sequenzen das 5' Exon und 5' flankierende Sequenzen bis zur Dra III Schnittstelle enthält. Damit konnten mögliche Probleme mit der geringen Endonuklease Aktivität der Nuklease S₁ umgangen werden. Die stärksten Signale stammen von DNA Fragmenten mit einer Länge von 96 - 101 Nukleotiden. Eine Probe, die DNA Sequenzen von der Hind III bis zur Dra III Schnittstelle enthält, ergibt im gleichen Experiment Fragmente, die 5 - 12 Nukleotide länger sind (nicht gezeigt). Dies kann nur damit erklärt werden, dass die RNA, die dieses DNA Fragment schützt, das tRNA^{Tyr} Intron ist. Die Nru I Schnittstelle ist 12 Nukleotide vom 3' Ende des Introns entfernt und diese Sequenz ist in der langen DNA Probe zusätzlich vorhanden.

In der Region der tRNA Vorläufer sind in Abb. 15a nur sehr schwache Banden sichtbar. Deshalb ist in Abb. 15b eine Überexposition desselben Gels gezeigt. Es lassen sich zwei Hauptbanden erkennen. Die kürzere hat eine Länge von 137 - 139 Nukleotiden. Die effektive Distanz vom 5' Ende zur Nru I Schnittstelle beträgt 138 Nukleotide. Es könnte sich hier also um einen 5' prozessierten tRNA^{Tyr} Vorläufer handeln. Die längere Bande ist 142 Nukleotide lang, dies würde einem 5' unprozessierten Vorläufer entsprechen, der mit G in Position -5 beginnt. Die Signale mit einer Länge von 209 - 228 Nukleotiden (Dra III - Nru I) sind auf Kontamination der Kern-RNA mit genomischer DNA zurückzuführen. Dieser Befund wird weiter unten noch diskutiert. Als Längenmarker wurde eine

Sequenzierreaktion mit dem Klon Y22Fa aufgetragen, wobei als Primer das ochre Oligonukleotid verwendet wurde.

Für Experimente mit dem Gen Y22Fb (Abb. 15c) wurden je 5 µg DNase I verdaut Kern-RNA verwendet. Als radioaktiv markierte M13 Probe diente das Acc I - Hind III Fragment (Abb. 5b). Die stärksten Signale entsprechen den tRNA^{Tyr} Exons. Die Bande mit einer Länge von 48 Nukleotiden ist sehr schwach zu erkennen in denjenigen Proben, die auch ein Signal mit einer Länge von 123 - 128 Nukleotiden zeigen. Die kürzere Bande entspricht aufgrund ihrer Länge dem tRNA^{Tyr} Intron. Für einen 5' und 3' prozessierten Vorläufer ist eine Länge von 121 Nukleotiden zu erwarten. Vorläufer, die nicht oder nur teilweise prozessierte Enden aufweisen sind je nach Initiation und Termination etwas länger. Die gute Übereinstimmung zwischen dieser Erwartung und

Abb. 15 (folgende Seiten):

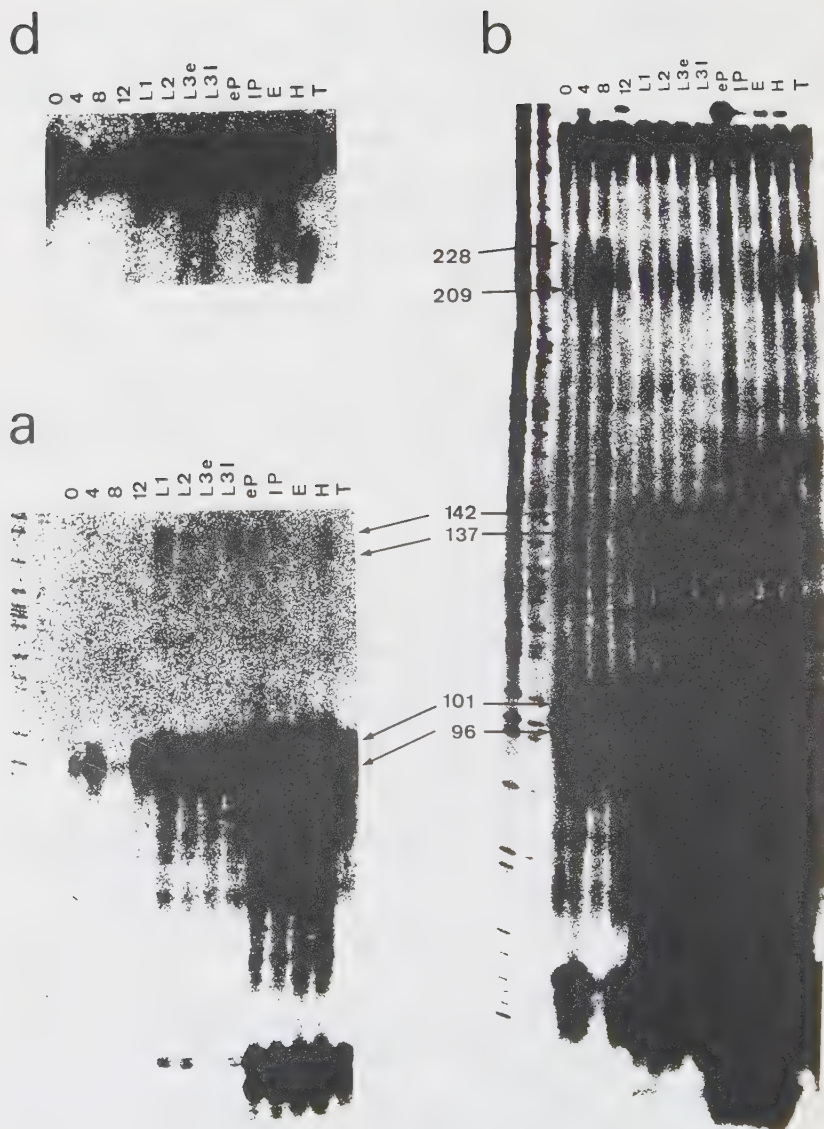
Nuklease S₁-Mapping von Kern-RNA Proben: verschiedene Stadien von *Drosophila melanogaster* wurden mit einzelsträngigen M-13 Proben analysiert. 0: 0-4h Embryonalstadien, 4: 4-8h Embryonalstadien, 8: 8-12h Embryonalstadien, 12: 12-18h Embryonalstadien, L1: 1. Larvalstadium, L2: 2. Larvalstadium, L3e: frühes 3. Larvalstadium, L3l: spätes 3. Larvalstadium, eP: frühe Puppen, lP: späte Puppen, E: Extremitäten, H: Köpfe, T: Rümpfe. Bei den 4-8h und 8-12h Embryonen kann eine Verwechslung der Kern-RNA nicht ausgeschlossen werden. Die Interpretation der Resultate der Rumpf-Fraktion wird dadurch erschwert, dass die Hybridisierung durch eine Kontamination (ev. Glykogen) in der RNA reduziert ist (siehe Text).

a) S₁ Analyse für Y28C: Die verwendete Probe enthält den grössten Teil der Intronsequenz, das 5' Exon und 5' flankierende Sequenzen des Gens Y28C (Nru I bis Dra III, Abb. 9b). Von jeder Fraktion wurden 2 µg Kern-RNA eingesetzt. 101nt entspricht der Intronsequenz, 137nt: 5' prozessierter Vorläufer, 142nt: 5' nicht prozessierter Vorläufer.

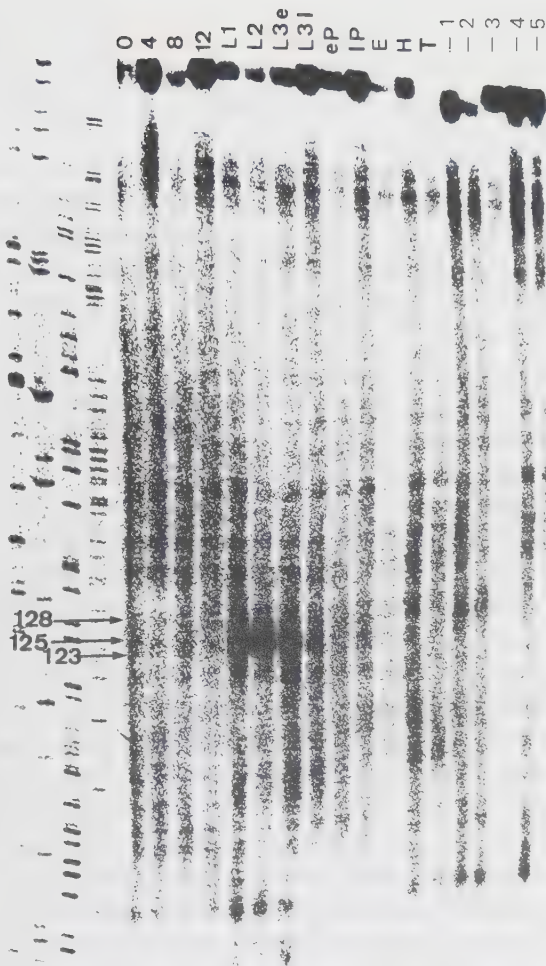
b) Überexposition von a). Zusätzliche Banden von 249-228nt: genomische DNA.

c) S₁ Analysen für Y22Fb: Die verwendete Probe enthält neben dem Intron beide Exons sowie 3' und 5' flankierende Sequenzen (Acc I - Hind III, Abb. 5b). Von jeder Fraktion wurden 5µg Kern-RNA eingesetzt. 123 - 128nt End prozessierte und nicht prozessierte Vorläufer. -1: rRNA + tRNA^{Tyr} Kontrolle, Hybridisierung bei 42°C; -2: rRNA + tRNA^{Tyr} Kontrolle Hybridisierung bei 39°C; -3: 5µg 0-4h Embryonalstadien, Hybridisierung bei 39°C; -4: rRNA + tRNA^{Tyr} Kontrolle, Hybridisierung bei 45°C; -5: 5 µg 4-8h Embryonalstadien, Hybridisierung bei 45°C.

d) Kontrolle mit U₆ snDNA Proben (B. Dawwalder, Zürich). Von jeder Fraktion wurden 0,1µg Kern-RNA eingesetzt.



C



dem Signal bei 123 - 128 Nukleotiden deutet darauf hin, dass dieses dem tRNA^{Tyr} Vorläufer des Gens Y22Fb entspricht.

Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass die beiden tRNA^{Tyr} Gene Y28C und Y22Fb von *Drosophila melanogaster* im intakten Organismus transkribiert und prozessiert werden. Da sie auch für die Hauptisoakzeptoren von tRNA^{Tyr} codieren, ist anzunehmen, dass sie trotz ihrer ungewöhnlichen Intronstrukturen funktionelle Gene sind.

Stadienspezifische Expression

Transfer-RNA^{Tyr} Gen Y28C

Die langen singulären Intronsequenzen der tRNA^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C ermöglichen es, die Transkription dieser zwei Gene in verschiedenen Stadien zu verfolgen, ohne sie zu mutieren. Dies ist möglich unter der Annahme, dass das Processing von Vorläufer-tRNA oder der Abbau der Intronsequenzen in allen Stadien etwa gleich schnell (und im Zellkern) vor sich geht. Die Kontrolle mit einer M13 Probe aus einem U6 snRNA Gen von *Drosophila melanogaster* soll dabei Hinweise darauf geben, ob wirklich Kern-RNA isoliert werden konnte (Abb. 15d). Falls diese Gene konstitutiv exprimiert werden, lassen sich damit die Resultate der Transkription von Y22Fb und Y28C quantifizieren. Für das Studium der stadienspezifischen Expression des Gens Y28C wurden 2 µg Kern-RNA von den verschiedenen Stadien eingesetzt (Abb. 15a und 15b). Ein Nachweis der Expression der Vorläufer-RNA (Banden 137-139 und 142) lässt sich im ersten Larvenstadium erbringen (15b). Diese ist dann unterschiedlich stark weiterhin bis zum adulten Stadium vorhanden. Bei den adulten Fraktionen fällt der Unterschied zwischen Kopf- und Rumpf-Fraktion auf. Grössere Unterschiede zeigt auch das Intronsignal (96-101 Nukleotide). Starke Signale sind in den Larvenstadien vorhanden. Bei Puppen und adulten Extremitäten- und Kopf-Fraktionen ist das Intronsignal nochmals verstärkt. Die Kontrollversuche (Nachweis von U6 snRNA) zeigen diesen Anstieg bei der Verpuppung nicht, dort sind die Signale eher noch schwächer als in

Larven (Abb. 15d).

Der Unterschied zwischen Embryonen und Larven könnte z.T. darauf zurückzuführen sein, dass die embryonalen Fraktionen von 4 - 8 stündigen und von 8 - 12 stündigen Embryonen mehr DNA enthalten als die übrigen Fraktionen (Banden bei 209 - 228 Nukleotide, siehe oben). Da die Nukleinsäurekonzentration aber durch Absorptionsmessung bestimmt wurde, enthalten diese Fraktionen entsprechend weniger RNA. Dies wurde auch auf einem Agarose Gel nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Kern-RNA Proben wurden deshalb mit DNase I verdaut und die extrahierten Proben bei Raumtemperatur mit Ethanol ausgefällt. Die Konzentration wurde wieder durch Absorptionsmessung bestimmt und auf einem Agarosegel getestet. Die so erhaltenen embryonalen und larvalen Kern-RNA Fraktionen zeigten nach Färbung mit Ethidiumbromid die gleiche Intensität und Grössenverteilung der RNA. 1,5 µg dieser embryonalen Kern-RNA Fraktionen und 1,5 µg der Fraktion des ersten Larvenstadiums wurden erneut mit S₁-Mapping quantifiziert. Dieses Experiment zeigte, dass die Kontamination mit genomischer DNA die oben beschriebenen Resultate nicht stark verfälschte. Im ersten Larvenstadium ist mehr Intron-RNA vorhanden als in den embryonalen Stadien (nicht gezeigt).

Demnach gibt es zwei markante Anstiege in der Menge der Y28C Intron-Fragmente. Im ersten Larvenstadium ist ein sprunghafter Anstieg von Vorläufer-tRNA Y28C parallel zur Akkumulation der dazugehörenden Intronsequenzen zu beobachten. In den frühen Puppenstadien erfolgt ein zweiter sprunghafter Anstieg der Intron-RNA, also unmittelbar nachdem auch ein Maximum in der Vorläufer-RNA Menge beobachtet wurde (spätes drittes Larvenstadium). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass diese Zunahme u.a. auf stärkere Transkriptionsaktivität zurückzuführen ist.

- 8 -

Transfer-RNA^{Tyr} Gen Y22Fb

Für dieses Experiment wurden DNase I verdaute Kern-RNA Proben verwendet (Abbildung 15c). Je 5 µg embryonale und larvale und 2,5 µg adulte Kern-RNA wurde eingesetzt. Die Resultate dieser Versuche sind weniger komplex. Vorläufer-tRNA^{Tyr} und die Intronsequenzen lassen sich im ersten, im zweiten und im frühen dritten Larvenstadium nachweisen.

Die Intron-RNA ist nur in den Stadien sichtbar, in denen auch die Vorläufer-lRNA^{Try} vorhanden ist und auch die Menge entspricht der Menge Vorläufer-lRNA. Dies deutet darauf hin, dass das lRNA^{Try} Gen Y22Fb in diesen Stadien exprimiert wird.

Für die Interpretation der Resultate von Abbildung 15 müssen die folgenden Einschränkungen gemacht werden: Die Expression der lRNA^{Try} Vorläufer in den Rumpf-Fractionen kann nicht quantitativ erfasst werden, da die Proben Verunreinigungen enthielten (ev. Glycogen), welche die Hybridisierung z.T. verhinderten. Die Nuklease S₁ Analysen mit 2 und 10 µg Kern-RNA aus dieser Fraktion ergaben schwächere Intronsignale bei 10 µg RNA (nicht gezeigt). Bei den 4 - 8 stündigen und bei den 8 - 12 stündigen Embryonen kann eine Verwechslung dieser Proben während der Kern-RNA Isolation nicht ausgeschlossen werden. Es wurden deshalb aus den Resultaten dieser drei Proben keine Schlüsse gezogen.

5. Polyadenylierte Transkripte in den lRNA^{Try} Genregionen

Das lRNA^{Try} Gen Y22Fb von *Drosophila melanogaster* liegt nur ca. 300 Nukleotide von der Polyadenylierungsstelle des DPP-C Transkriptes entfernt (Abb. 20a). Die anderen klonierten lRNA^{Try} Gene sind ebenfalls in cytologischen Regionen lokalisiert worden, die entwicklungsbiologisch interessant sind. In der Region 85A wurde das *hunchback* Gen lokalisiert (Lehmann and Nüsslein-Vollhard, 1987) und in der Region 28C ein Transkript, das nur im Kopf von adulten Tieren gefunden wurde (Levy and Manning, 1982; Levy et al., 1982). Die folgenden Experimente sollen zeigen, ob die lRNA^{Try} Gene aus den Regionen 85A und 28C ebenfalls in der Nähe von Polymerase II-Genen codiert sind.

Je 5 µg glyoxylierte poly(A)*-RNA (aus denselben Stadien und adulten Fractionen wie die Kern-RNA) wurden in eine Agarose Gellasche von 3mm Breite aufgetragen. Als Längenmarker diente ein Gemisch von Hefe rRNA (Pharmacia) und TMV-RNA (siehe B. Suter, 1982). Nach der Elektrophorese wurde die poly(A)*-RNA auf GeneScreen Filter transferiert. Damit der Filter mit guter Effizienz wiederholt verwendet

werden konnte, wurde die RNA durch UV Crosslinking zusätzlich an den Filler gebunden (Saluz and Jost, 1986).

In einem ersten Versuch wurde mit einer nick-translierten Plasmidprobe hybridisiert, damit Transkripte von beiden DNA Strängen nachgewiesen werden konnten.

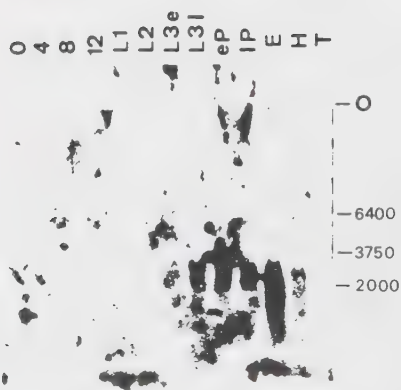
Polyadenylierte Transkripte der Region 28C

Transkripte in der Nähe des tRNA^{Tyr} Gens Y28C konnten mit einer Plasmidprobe, die das 3,5 kb EcoR 1 Fragment mit dem tRNA^{Tyr} Gen enthält, nachgewiesen werden. Die Resultate dieses Experimentes sind in Abbildung 16 gezeigt. Eine oder mehrere poly(A)*-RNA mit komplementären Sequenzen zum 3,5 kb EcoR 1 Fragment treten vom 3. Larvenstadium an auf. Sie sind in Puppen verstärkt vorhanden und vor allem in der Extremitäten-Fraktion vertreten. In dieser Probe sind zwei bis drei verschiedene Transkripte vorhanden. Ihre Länge wurde auf 1,3 kb bis 2,2 kb geschätzt. Die 1,3 kb und die 1,9 kb RNA ist in der Extremitäten-Fraktion dominierend. In den anderen Stadien und Fraktionen finden sich nur Spuren dieser Transkripte. Die 2,2 kb RNA ist in Puppen am stärksten vertreten, etwas schwächer aber auch im 3. Larvenstadium und in den adulten Fraktionen.

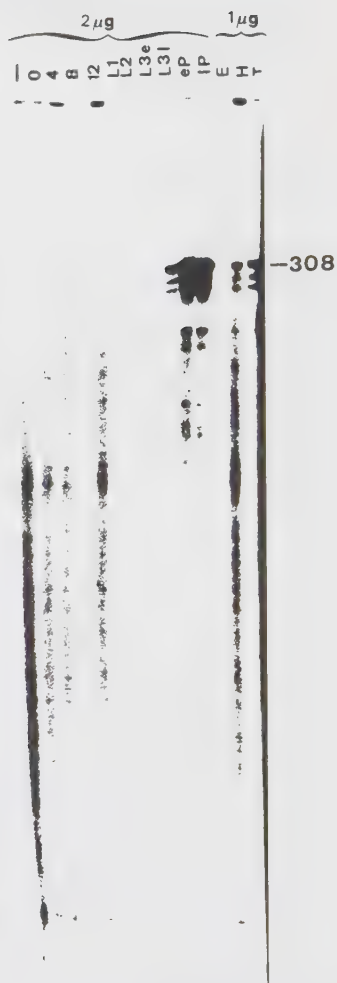
Eine radioaktive M13 Einzelstrang Probe, die das 0,44 kb EcoR 1 - Hind III Fragment unmittelbar 3' des tRNA^{Tyr} Gens enthielt, wurde synthetisiert. Mit S₁-Mapping konnte gezeigt werden, dass eine poly(A)*-RNA in diesem Fragment codiert ist. Sie wird von der Hind III zur EcoR 1 Schnittstelle transkribiert, also in derselben Richtung, wie die tRNA^{Tyr} (Abb. 20b). Für dieses Experiment wurde je 1 µg poly(A)*-RNA aus späten Puppen verwendet.

Die stadienspezifische Expression dieser poly(A)*-RNAs und deren Länge sollten zeigen, um welches der oben beschriebenen Transkripte es sich dabei handelt. Dies wurde einerseits mit S₁-Mapping (Abb. 17a) und andererseits mittels Northern-Analyse getestet (Abb. 17b). Für die S₁ Experimente wurden je 2 µg embryonale und larvale und je 1 µg adulte poly(A)*-RNA verwendet. Für die Northern-Analyse wurde derselbe Filter verwendet, der schon für die Northern-Analyse der 85A Transkripte

16



17a



17b

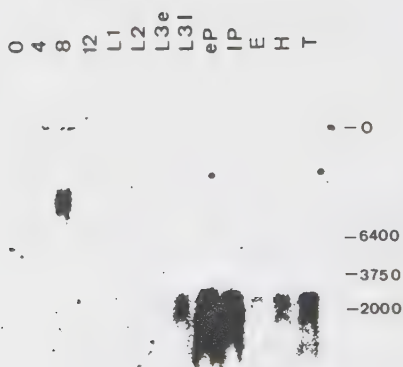


Abb. 16:

Northern-Analyse von je 5 µg poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Stadien von *Drosophila melanogaster*. Als radioaktive Probe wurde ein nick-transliertes Plasmid verwendet, welches das 3,5 kb Eco R₁ Fragment mit dem tRNA^{Tyr} Gen Y28C enthält (Abb. 9). Längenmarker waren Hefe rRNA (2000nt, 3750nt) und TMV RNA (6400nt). 0 bezeichnet den Startpunkt der Elektrophorese. Bezeichnung der Fraktionen wie in Abb. 15.

Abb. 17:

Bezeichnung der Fraktionen wie in Abb. 15.

- a) S₁-Analyse von je 2 µg embryonalen und larvalen bzw. 1 µg adulten poly(A)⁺-RNA Fraktionen. Die einzelsträngige M-13 Probe enthält das 0,44 kb EcoR I - Hind III Fragment unmittelbar 3' des Y28C Gens (Abb. 9b, 20b). Die Hind III Schnittstelle bildet das 3' Ende der Probe.
- b) Northern-Analyse mit der unter a) beschriebenen M-13 Probe. RNA wie in Abb. 16. Dieser Filter wurde zuvor für die Versuche mit der Y85Aabc Probe verwendet (Abb. 18a).

verwendet worden war (nächster Abschnitt). Das Expressionsmuster entspricht in beiden Fällen der 2.2 kb RNA. Aus den Nuklease S₁ Experimenten ist ersichtlich, dass 308 Nukleotide der verwendeten Probe gegen den Abbau durch die Nuklease geschützt sind. Zusätzlich sind geschützte Banden von ca. 50 Nukleotiden Länge sichtbar. Ihre Intensität in den einzelnen Fraktionen ist proportional zu derjenigen der langen Bande. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden Fragmente mit einer Länge von 308 und 50 Nukleotiden vom gleichen Transkript geschützt werden und durch ein Intron voneinander getrennt sind.

Die Resultate aus der Northern-Analyse und aus den S₁-Mapping Versuchen mit dem 0,44 kb EcoR I - Hind III Fragment lassen folgende Schlüsse zu:

- Ein Teil einer 2,2 kb poly(A)⁺-RNA ist auf dem 0,44 kb Hind III - EcoR₁ Fragment codiert.
- Die Transkription des poly(A)⁺-RNA Gens und des benachbarten tRNA^{Tyr} Genes Y28C erfolgt in derselben Richtung.
- Die poly(A)⁺-RNA akkumuliert am stärksten in Puppen. Die Transkription beginnt im dritten Larvenstadium und Transkripte lassen sich bis zu den adulten Fraktionen nachweisen.
- Vermutlich sind im 0,44kb Hind III - EcoR I Fragment Teile von zwei verschiedenen Exons dieser poly(A)⁺-RNA codiert.

- Die Transkripte in diesem Teil der RNA haben vermutlich in allen Stadien die gleiche Struktur.

Polyadenylierte Transkripte der Region 85Aabc

Hier wurde ebenfalls wie oben beschrieben vorgegangen. Der verwendete Northernfilter wurde parallel zum oben beschriebenen hergestellt. Die erste Hybridisierungsprobe war ein nick-transliertes Plasmid das das 1,8 kb EcoR 1 Fragment enthält, auf dem auch die drei tRNA^{Tyr} Gene codiert sind. Abbildung 18a zeigt, dass eine poly(A)⁺-RNA mit einer Länge von ca. 3.2 kb, Sequenzen enthält, die komplementär zu einem Teil dieses Fragmentes sind. Die RNA ist im Embryo vorhanden und die Markierung nimmt gegen Ende der Embryogenese ab. In der Larve ist sie wieder vorhanden und erreicht im zweiten Larvenstadium ein Maximum. In der Puppe ist sie kaum sichtbar und in adulten Extremitäten und Köpfen erscheint diese Bande erneut. Radioaktive M13 Proben, die praktisch alle Sequenzen des EcoR 1 Fragmentes abdecken, wurden gegen 1 µg poly(A)⁺-RNA aus dem zweiten Larvenstadium hybridisiert, mit Nuklease S₁ verdaut und auf einem Sequenziergel analysiert. Die radioaktive DNA Probe, die das EcoR 1 - Pvu II Fragment in dieser Orientierung (5' → 3') enthielt, wurde durch die RNA gegen Abbau geschützt. Auf diesem Fragment muss also ein Teil einer poly(A)⁺-RNA codiert sein (Abb. 20c). Die Transkription erfolgt in der entgegengesetzten Richtung als die der tRNA^{Tyr} Gene. Die Länge der geschützten Fragmente beträgt ca. 265 - 276 Nukleotide. Mit dieser Probe und Nuklease S₁-Mapping wurde geprüft, ob dieses Transkript dasselbe Expressionmuster zeigt, wie die poly(A)⁺-RNA, die durch Northernhybridisierung gefunden wurde. Gleichzeitig kann mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die RNA Struktur in diesem Teil der RNA in allen Fraktionen übereinstimmt. Es wurden 2 µg embryonale, larvale und pupale, bzw. je 1 µg adulte poly(A)⁺-RNA eingesetzt (Abb. 18b). Das Expressionmuster stimmt mit dem Northernexperiment überein: starke Akkumulation der RNA in frühen Embryonen und fast keine Transkripte mehr in späten Embryonen; erneutes Auftreten in der Larve, mit einem Maximum im zweiten Larvenstadium und anschliessendes

Absinken. Schwache Signale finden sich aber auch in allen adulten Fraktionen.

Ich wollte weiter abklären, ob dieses DNA Fragment für das 5' Ende der poly(A)⁺-RNA codiert oder für ein anderes Exon. Dazu eignet sich die *Primer Extension* Technik. Es wurde wiederum eine radioaktive M13 Probe synthetisiert, die auf ihrer 5' Seite die EcoR 1 Schnittstelle enthielt und die bei der ersten Xho I Schnittstelle endet (3' Ende). Diese wurde gegen 2 µg poly(A)⁺-RNA aus dem zweiten Larvenstadium hybridisiert und anschliessend ausgefällt. Mit Hilfe von Reverse Transkriptase wurde der radioaktiv markierte DNA Primer bis zum 5' Ende der poly(A)⁺-RNA verlängert. Die Analyse der Produkte dieser Reaktion erfolgte nach der Auftrennung auf einem Sequenziergel mittels Autoradiografie (Abb. 18c). Als Kontrolle wurde rRNA von *E. coli* verwendet. Die beiden Banden, die in der Kontrolle nicht auftreten, haben eine Länge von 346 und 348 Nukleotiden. Da hier noch die 71 Nukleotide Vektor DNA (Primer und Multicloning Site) enthalten sind, ergibt sich daraus eine effektive Länge von 275 und 277 Nukleotiden. Der Vergleich mit den S₁-Experimenten, die geschützte Fragmente mit der Länge von 265 - 276 Nukleotiden ergaben, zeigt, dass diese Transkripte in der Region von 270 - 280 der Sequenz in Abbildung 7c beginnen (siehe auch Abb. 20c). Das gleiche Primer Extension Experiment wurde auch mit einem radioaktiven Primer durchgeführt, der dasselbe 5' Ende hat, dessen 3' Ende aber bei der Pvu II Schnittstelle liegt (Abb. 20c). Dieses Experiment ergibt ein diffuses Signal, das in der Kontrolle nicht vorhanden ist. Dieses Signal liess sich nicht einer Bande in den Nuklease S₁-Experimenten zuordnen. Seine Herkunft wurde nicht weiter untersucht.

Polyadenylierte Transkripte der Region 85Ade

Bei diesem Klon wurde das 4,3 kb EcoR 1 - Sal I Fragment (EcoR 1 Linker am Insertende), das die beiden tRNA^{Tyr} Gene enthält, nick-transliert und an denselben Filter hybridisiert, der schon für die nick-translierte Probe aus dem 28C Locus verwendet wurde. Auch dieses Fragment scheint für mindestens eine poly(A)⁺-RNA zu codieren. Diese

a

0 4 8 12 11 12 13e 13i ep 1p E H T



C

Xho Pvu
+ +
4 4

b

2 μ g 1 μ g

0 4 8 12 11 12 13e 13i ep 1p E H T

276-

265-



346/8

Pr

Pr

Abb 18:

Bezeichnung der Fraktionen wie in Abb. 15.

- a) Northern-Analyse von je 5µg poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Stadien von *Drosophila melanogaster*. Als radioaktive Probe wurde ein nick-transliertes Plasmid verwendet, welches das 1,8 kb EcoR I Fragment mit den tRNA^{Arg} Genen Y85Aa, b und c enthält (Abb. 7b). Längenmarker waren Hefe rRNA (2000nt, 3750nt) und TMV RNA (6400nt). 0 bezeichnet den Startpunkt der Elektrophorese.
- b) S₁-Analyse von je 2µg embryonalen und larvalen bzw. 1µg adulten poly(A)⁺-RNA Fraktionen. Die einzelsträngige M-13 Probe enthält das 0,44 kb EcoR I - Pvu II Fragment (Abb. 7b, 20c). Die Pvu II Schnittstelle bildet das 3' Ende der Probe.
- c) Primer extension Experiment mit 2µg poly(A)⁺-RNA aus dem zweiten Larvenstadium (A⁺) bzw. *E. coli* rRNA (-). Als radioaktiver Primer (Pr) wurde die Probe verwendet, die unter b) beschrieben ist (Pvu) und eine, die am 5' Ende identisch ist, aber bei der ersten Xho I Schnittstelle endet (Xho). 346/8 bezeichnet die Länge des verlängerten Primers, der durch reverse Transkription der poly(A)⁺-RNA entstanden ist.

hat eine Länge von 2,3 kb (wie eine der 28C RNA). Sie tritt zum ersten mal in späten Embryonen auf und erreicht ein Maximum im späten dritten Larvenstadium. In der frühen Puppe ist sie nur schwach erkennbar, in späten Puppen aber wieder sehr stark. In den adulten Fraktionen konnte sie nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 19). Bei 8 - 12 stündigen Embryonen erscheint ein starkes Signal bei etwa 11 kb und ein schwaches bei ca. 3 kb. Ein ähnliches oder dasselbe 11kb Signal findet man auch auf dem Filter, der mit der M13 Probe aus 28C hybridisiert wurde (Abb. 17b). Es sind deshalb zusätzliche Experimente nötig, um herauszufinden, ob diese Signale nicht durch unvollständiges Wegwaschen der 28C Probe entstanden sind. Dies scheint zwar eher unwahrscheinlich, da zwischen den zwei Hybridisierungen mehr als 4 Halbwertszeiten vergangen waren und das Signal bei der Hybridisierung mit der 85Ade Probe viel stärker war, als mit der nick-translierten 28C Probe (Abb. 16). Denkbar wäre allerdings, dass die ursprüngliche Hybridisierungsprobe nicht vollständig gewegewaschen und deshalb mit der Probe von 85Ade (die auch Plasmiden DNA enthält und mit höherer spezifischen Aktivität nick-transliert wurde) markiert wurde.

Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass alle tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* in der Nähe von Genen lokalisiert sind, die für poly(A)⁺-RNA codieren (Abb 20), und dass diese auf unterschiedliche Art stadienspezifisch reguliert werden.

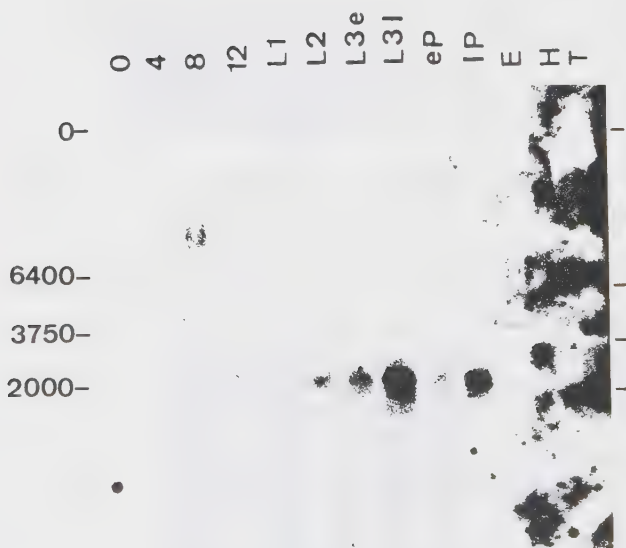


Abb 19:

Northern-Analyse von je 5µg poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Stadien von *Drosophila melanogaster*. Als radioaktive Probe wurde ein nick-transliertes Plasmid verwendet, welches das 4,3 kb EcoR I - Sal I Fragment mit den tRNA^{Tyr} Genen Y85Ade enthält (Abb. 8). Längenmarker waren Hefe rRNA (2000nt, 3750nt) und TMV RNA (6400nt). 0 bezeichnet den Startpunkt der Elektrophorese. Fraktionen Bezeichnung wie in Abb. 15; der Filter wurde bereits für ein anderes Experiment verwendet (Abb. 16).

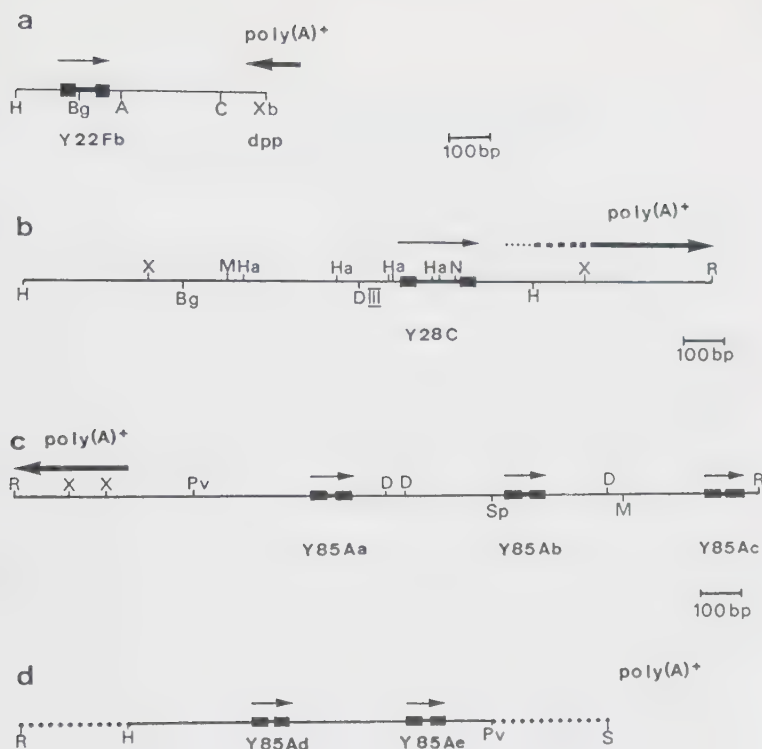


Abb 20:

Transkription von Pol II- und Pol III-Genen in der Region von *Drosophila melanogaster* tRNA^{tyr} Genen. Dünne Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der tRNA^{tyr} Gene an. Dicke Pfeile die Transkriptionsrichtung der Pol II-Genen.

A: Acc I Bg: Bgl II C: Cla I D: Dra I DIII: Dra III
 Ha: Hae III H: Hind III M: Mlu I N: Nru I Pv: Pvu II
 R: EcoR I S: Sal I Sp: Sph I X: Xho I Xb: Xba I

- a) Y22Fb (DPP-C). Die Polyadenylierungsstelle des *DPP-C Transkriptes liegt bei der Pfeilspitze (Padgett et al, 1987).
- b) Y28C. Ein Exon der poly(A)⁺-RNA beginnt beim Anfang des ausgezogenen dicken Pfeils. Ein 50 bp Exon ist durch die unterbrochene dicke Linie (unmittelbar vor dem Pfeil) symbolisiert. Seine exakte Lokalisation ist noch nicht bekannt. Die Ausdehnung dieses Exons in seiner 5' Richtung (....) wurde nicht analysiert.
- c) Y85Aabc. Das 5' Ende der poly(A)⁺-RNA befindet sich beim Anfang des Pfeils.
- d) Y85Ade. Die poly(A)⁺-RNA wurde nicht lokalisiert.

IV. DISKUSSION

1. Transfer-RNA^{Tyr}

Die Sequenz G/Q Ψ A m¹G ist ein Charakteristikum aller bisher sequenzierten tRNA^{Tyr} höherer Eukaryonten. Sie findet sich ebenfalls bei tRNA^{Tyr} von *Xenopus laevis* (Laski et al., 1982; Filipowicz and Shatkin, 1983), bei verschiedenen Pflanzen (Beier et al., 1984a; Beier et al., 1984b; Barciszewski et al., 1985) und bei der Rindsleber tRNA^{Tyr} (Johnson et al., 1985). In dieser Sequenz unterscheidet sich diese Gruppe von den entsprechenden Hefe tRNA^{Tyr} Sequenzen von *S. cerevisiae* und *S. pombe*, die in der Position 37 (anschliessend an das Anticodon) die Modifikation i⁶A besitzen (Sprinzl et al., 1985). Dies ist interessant im Zusammenhang mit der Q-Modifikation, die in Hefe tRNA nie auftritt. Eine zweite tRNA der vier tRNA Species enthaltenden Q-Familie zeigt in dieser Position ebenfalls einen Unterschied zwischen Hefe und höheren Eukaryonten. Alle tRNA^{Asp} von höheren Eukaryonten besitzen ein unmodifiziertes A, die Hefe tRNA^{Asp} ein m¹G in Position 37 (Sprinzl et al., 1985). Die Präsenz eines A's in dieser Position bewirkt in der *Xenopus* Oocyte eine sehr schnelle und vollständige Modifizierung des G's in der Wobble Base (Position 34) zu manQ. Wird jedoch tRNA^{Asp} von Hefe in die *Xenopus* Oocyte injiziert, so bewirkt die Modifikation m¹G in Position 37 nur eine partielle Q Modifizierung der Wobble Base (Carbon et al., 1983; Haumont et al., 1984; Grosjean et al., 1987). Die Modifikation m¹G in den tRNA^{Tyr} von höheren Eukaryonten könnte also der Grund dafür sein, dass diese tRNAs in der Wobble Base nicht vollständig modifiziert sind und dass sie ein nicht glykosyliertes Q enthalten. Dafür sprechen auch Befunde von Nishikura und de Robertis (1981). Sie injizierten Hefe tRNA^{Tyr} Gene (mit A₃₇) in *Xenopus* Oocytenkerne und untersuchten, welche Modifikationen im Verlauf der tRNA Reifung gebildet werden. Das A₃₇ wurde zu i⁶A modifiziert. Das G₃₄ zu Q und zu einem glykosylierten Q-Derivat. Die Base in Position 37 beeinflusst also die Modifikation der Wobble Base auf die folgende Weise:

Position 37	Position 34	tRNA
m ¹ G	G / Q	Tyr, höhere Eukaryonten His, <i>Drosophila melanogaster</i> His, Schaf-Leber Hefe Asp in <i>Xenopus</i> Oocyten
i ⁶ A	G / Q / manQ	Hefe Tyr in <i>Xenopus</i> Oocyten
A	man Q	Asp, <i>Xenopus</i> und div. Säuger-Lebern

Die Referenzen dazu sind im Text erwähnt oder finden sich bei Sprinzl et al. (1985) und Meier et al. (1985).

Aus den Studien von Grosjean et al. (1987) geht aber auch hervor, dass noch weitere Strukturen der Anticodon Region diese Modifikationen kontrollieren.

Ein Vergleich der *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} und tRNA^{Phe}₂ Sequenzen (Altwegg and Kubli, 1979) zeigt eine sehr starke Homologie in allen Regionen ausser dem Aminoacylstamm. Von Nukleotid 8 bis 65 stimmen 47 von 58 Nukleotiden (81%) überein. Diese starke Homologie führt zur Frage, welche Sequenzen der tRNA^{Tyr} dann noch für die spezifische Erkennung durch die Tyrosyl-tRNA Synthetase verwendet werden können. Ein Vergleich der bekannten eukaryontischen tRNA^{Tyr} Sequenzen mit publizierten tRNA^{Phe} Sequenzen sollte zeigen, aufgrund welcher Nukleotide die Tyrosyl-tRNA Synthetase zwischen tRNA^{Tyr} und tRNA^{Phe} diskriminieren kann. Diesem Vorgehen liegen folgende Beobachtungen zugrunde:

- 1) Die *Drosophila melanogaster* Tyrosyl-tRNA Synthetase kann folgende getesteten tRNA^{Tyr} aminoacylieren: Hefe, *Drosophila*, *Lupinus* (eigene Beobachtungen).
- 2) Die *Xenopus laevis* Tyrosyl-tRNA Synthetase kann folgende getesteten eukaryontischen tRNA^{Tyr} aminoacylieren: *Drosophila*, Hefe, *Lupinus*, *Xenopus* (eigene Beobachtungen).
- 3) *E. coli* tRNA^{Tyr} kann mit *Drosophila melanogaster* Tyrosyl-tRNA Synthetase nicht aminoacyliert werden. (Deshalb wurden nur eukaryontische, kerncodierte tRNAs für diese Untersuchung berücksichtigt.)

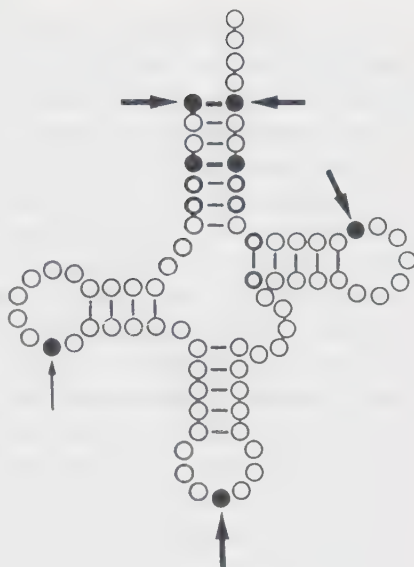
In einem ersten Schritt wurde für jede Position der eukaryontischen, kerncodierten tRNA^{Tyr} alle vorkommenden Nukleotide ermittelt.

Diejenigen Positionen, in denen die *Drosophila melanogaster* tRNA^{Phe} mit keiner tRNA^{Tyr} übereinstimmt, wurden daraufhin untersucht, ob auch keine andere eukaryontische tRNA^{Phe} in diesen Positionen mit irgendeiner tRNA^{Tyr} übereinstimmt. Die tRNA^{Phe} Daten stammten von Sprinzl et al. (1985). Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Es wurden 6 Positionen in der tRNA^{Tyr} gefunden, die nie mit einer der 21 sequenzierten Phenylalanin tRNAs übereinstimmen. Die Position 69 stimmt nur bei Hefe tRNA^{Phe} mit pflanzlicher tRNA^{Tyr} überein. Sie führt dann aber zu einer G-U Basenpaarung im Akzeptor Stamm, so dass hier trotzdem eine spezifische Erkennung durch die Tyrosyl-tRNA Synthetase möglich wäre. Diese 7 Positionen sind in Abbildung 21 als ausgefüllte Kreise in der Kleeblatt Struktur dargestellt. Von diesen Positionen sind diejenigen mit dicken Pfeilen markiert, die bei allen tRNA^{Tyr} Sequenzen identisch sind. Gleiche Basissequenz ist mit einem dünnen Pfeil markiert. Aus der Darstellung geht hervor, dass sie alle in denjenigen Regionen der tRNA liegen, die schon früher als wichtig für die Interaktion von Aminoacyl-tRNA Synthetasen mit der tRNA erkannt wurden (P. Schimmel, 1979; Schimmel and Söll, 1979; Ebel et al., 1979; Igloi and Cramer, 1978). Positionen, die nur bei tierischen Phenylalanin tRNAs nie mit einer tRNA^{Tyr} übereinstimmen, wurden als dick ausgezogene Kreise dargestellt, da nicht bekannt ist, ob pflanzliche Phenylalanin tRNAs von tierischen Aminoacyl-tRNA Synthetasen erkannt werden. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die eukaryontischen Tyrosyl-tRNA Synthetasen vermutlich einen Teil dieser sieben Positionen für die Unterscheidung zwischen tRNA^{Tyr} und tRNA^{Phe} und damit zur Erkennung der korrekten tRNA (tRNA^{Tyr}) benötigen.

M. Bienz (1981) fand, dass der tRNA^{Tyr}-G Isoakzeptor von *Drosophila melanogaster* Wildtypfliegen das TMV amber Terminationscodon supprimieren kann. Der Q-Isoakzeptor hingegen stimuliert die Synthese des TMV readthrough Proteins nicht (Biens and Kubli, 1981, B. Suter, 1982). Die Sequenzanalyse sollte zeigen, ob die Q-Modifikation die Suppression des leaky amber Terminationscodon verhindert. Falls noch andere Unterschiede zwischen dem Q- und G-Isoakzeptor existieren, könnten auch diese die unterschiedliche Suppressionsaktivität bewirken. Gleichzeitig wurden auch die G- und Q-Isoakzeptoren der genetisch

Abb. 21:

Mögliche Erkennungsstellen für eukaryontische Tyrosyl-tRNA Synthetasen, die eine Unterscheidung zwischen tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr} erlauben. Die tRNA ist in der Standard Kleeblatt Struktur gezeichnet. Die Nukleotide sind durch Kreise symbolisiert. Ausgefüllte Kreise geben diejenigen Positionen oder Basenpaarungen an, die in keiner tRNA^{Tyr} mit einer tRNA^{Phe} übereinstimmen. Von diesen Positionen sind diejenigen mit einem dicken Pfeil markiert, die in allen tRNA^{Tyr} identisch sind. Der dünne Pfeil bedeutet, dass die Basissequenz bei allen tRNA^{Tyr} in dieser Position identisch ist (nur Modifikationsunterschiede). Dick ausgezogene Kreise kennzeichnen Positionen, in denen nur pflanzliche tRNA^{Phe} mit einer tRNA^{Tyr} übereinstimmen.



charakterisierten Suppressor Mutante *su(s)²* sequenziert. Damit sollte die molekulare Grundlage für eine andere Beobachtung aufgeklärt werden: Der Q-Isoakzeptor von *su(s)²* Fliegen supprimiert im Unterschied zum Q-Isoakzeptor von Wildtypfliegen das TMV amber Terminationscodon (M. Bienz, 1981; B. Suter, 1982; B. Dauwalder, 1984). Die Sequenzierung dieser 4 tRNA^{Tyr} Isoakzeptoren ergab, dass alle vier dieselbe Basissequenz haben. Dies bedeutet, dass die G- und Q-Isoakzeptoren vom selben Gen codiert werden können. Die Q-Modifikation der Wobble Base ist aufgrund der Basenanalyse in drei verschiedenen Laufmitteln bei der Suppressor Mutante und beim Wildtyp identisch.

Auch die übrigen Modifikationen stimmen zwischen den beiden Q-Isoakzeptoren qualitativ überein. Je nach Isolation schwankt der Modifikationsgrad von rT₅₄ beim Q-Isoakzeptor zwischen 12% rT₅₄ (*su(s)²* tRNA^{Tyr}-Q) und über 60% rT₅₄ (Wildtyp tRNA^{Tyr}-Q). Das Ausmass der partiellen Methylierung des U's in Position 54 zu rT könnte die Stabilität der tRNA Bindung ans Ribosom beeinflussen (H. Kersten, 1984). Weitere Versuche mit Proben von anderen tRNA Isolationen konnten aber

keine eindeutige Korrelation zwischen Untermethylierung und readthrough Aktivität nachweisen. Der Grad dieser Methylierung könnte deshalb wohl modulierenden Einfluss auf die Suppressionsaktivität haben, kann aber nicht die eigentliche Ursache für die unterschiedliche Suppressionsaktivität der beiden Q-Isoakzeptoren sein.

Als möglicher Unterschied kommt eine (ev. partielle) zusätzliche Modifikation bei der Suppressormutante in Frage, die in der Sequenzanalyse nicht nachgewiesen werden kann (z.B. partielles m^5C in Position 40), oder eine zusätzliche Modifikation in einem der beiden $tRNA^{Tyr}-Q$ Isoakzeptoren, die während der Basenanalyse abgespalten wird. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, dass in einem Sequenzierungsansatz nach der Methode von Stanley und Vassilenko (1978) in der Basenanalyse der acp^3U Bande neben den üblichen Flecken $pacp^3U$ und $pacp^3UpA$ (Ohashi et al., 1974) beim Wildtyp noch ein zusätzlicher Flecken gefunden wurde, der bei der Suppressormutante nicht vorhanden war (nicht gezeigt). Diese Modifikation konnte nicht identifiziert werden. Es wäre aber denkbar, dass es sich um eine Veresterung der Carboxylgruppe handelt, die während der Basenanalyse abgespalten wird.

Ein Vergleich der beiden Wildtyp $tRNA^{Tyr}$ Isoakzeptoren zeigte neben der Modifikation der Wobble Base keinen weiteren Unterschied. Aus den oben diskutierten methodischen Gründen geht daraus aber nicht zwingend hervor, dass dies die alleinige Basis für die unterschiedliche Suppressionsaktivität ist. Die Resultate mit pflanzlicher $tRNA^{Tyr}$ deuten allerdings auch darauf hin, dass die Q-Modifikation allein die Suppressionsaktivität verhindert (Beier et al., 1984a und 1984b).

Die Frage nach dem molekularen Unterschied zwischen den beiden $tRNA^{Tyr}-Q$ Isoakzeptoren von $su(s)^2$ und Wildtypfliegen wurde jedoch noch komplizierter durch Befunde von Y. Choffat, die zeigten, dass der $tRNA^{Tyr}-Q$ Isoakzeptor von Wildtypfliegen, die auf einem veränderten, Hefe-reicheren Futter gezüchtet wurden, ebenfalls ein Suppressor des TMV Terminationscodon ist. Dies bedeutet, dass die Suppressionsaktivität der Q-Isoakzeptoren vermutlich auf einem Pleiotropie Effekt beruht, der entweder durch $su(s)^2$ (ein Gen, das vermutlich für ein Protein codiert, Chang et al., 1986) oder durch die Futterzusammensetzung entsteht. Der Einfluss des Futters auf Modifikation und Suppressionsaktivität des

Wildtyp tRNA^{Tyr}-Q Isoakzeptors wurde von C. Ryffel (1986) untersucht und ausführlich diskutiert.

Da die Suppressionsversuche in *Xenopus* Oocyten durchgeführt wurden, habe ich geprüft, ob die Wildtyp tRNA^{Tyr}-Q von der *Xenopus* Tyrosyl-tRNA Synthetase (ein Geschenk von S. Clarkson, Genf) aminoacyliert werden kann. Da dies der Fall ist (Resultate nicht gezeigt), dürfte die unterschiedliche Suppressionsaktivität auf unterschiedlichen Interaktionen mit einem der übrigen Elemente des Proteinsynthesystems beruhen. Eine andere Möglichkeit wäre ein schneller Austausch von Q durch G beim *su(s)*² Isoakzeptor in den beiden Assay Systemen *Xenopus* Oocyte und Reticulocytes *in vitro* System. Ein derartiger Austausch ist von Okada et al. (1976) im Kaninchen Reticulocytensystem nachgewiesen worden.

2. Expression der tRNA^{Tyr} Gene: Struktur der Vorläufer, Reifung der tRNA^{Tyr} und Ψ-Modifikation

a) Intronsequenzen

Die Präsenz von Introns in kerncodierten tRNA Genen gilt eher als Ausnahme. Sequenzanalysen von tRNA Genen mit Intron führten zur Hypothese, dass Introns in verschiedenen Genen, die für denselben Isoakzeptor codieren, innerhalb einer Art sehr ähnlich sind (Sharp et al., 1985). Allerdings wurden diese Untersuchungen vor allem mit Hefe tRNA Genen durchgeführt. Die bisher analysierten tRNA^{Tyr} Gene von *Saccharomyces cerevisiae* (De Robertis and Olson, 1979; Goodman et al., 1977, Johnson and Abelson, 1983), *Xenopus laevis* (Müller and Clarkson, 1980; Gouilloud and Clarkson, 1986) und *Drosophila melanogaster* (diese Arbeit) enthalten alle ein Intron. Die acht tRNA^{Tyr}⁴ Gene von *S. cerevisiae* (Hawthorne and Leupold, 1974) haben in der Tat sehr ähnliche Sequenzen (Ogden et al., 1984). Die Resultate der Sequenzanalysen der *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} Gene waren deshalb erstaunlich. In den acht analysierten Genen, die alle in ihrer codierenden Sequenz identisch sind, treten vier verschiedene Introntypen auf (Abb. 10). Gouilloud und Clarkson (1986) fanden bei *Xenopus* ebenfalls ein tRNA^{Tyr} Gen, das einen

anderen Introntyp enthält als das bisher bekannte tRNA^{Tyr} Gen. Obwohl sich die beiden *Xenopus* Gene in der Position 57 (3'ICR = B-Box) unterscheiden (G bzw. A) und somit nicht für denselben Isoakzeptor codieren, könnte dies bedeuten, dass die oben erwähnte Hypothese für tRNA^{Tyr} Gene von höheren Eukaryonten nicht zutrifft.

Intergenische Konversionsprozesse, wie sie bei Hefe schon länger bekannt sind (Munz et al., 1982), scheinen auch bei *Drosophila* tRNA^{Ser} Genen aufzutreten (D. Cribbs, pers. Mitteilung). Die Divergenz in der Länge und Sequenz der verschiedenen Introntypen der *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} Gene verhindert eine Genkonversion über das ganze tRNA Gen. Nach Amstutz et al. (1985) genügt bei Hefe eine Länge von 18-33 homologen Basenpaaren für das Auftreten von Konversionsprozessen. Somit wäre denkbar, dass bei *Drosophila* eine Genkonversion über alle tRNA^{Tyr} Gene hinweg nur zwischen den einzelnen codierenden Regionen der Gene erfolgt.

b) Introntypen und Anordnung der verschiedenen tRNA^{Tyr} Gene im Genom

Die acht tRNA^{Tyr} Gene mit den verschiedenen Introntypen (Abb. 10) sind nicht zufällig auf die tRNA^{Tyr} enthaltenden Regionen verteilt:

- 1) Zum einzigen Introntypus, der in mehreren tRNA^{Tyr} Genen vorhanden ist, gehören alle 85A Gene. Sie sind in zwei Clusters angeordnet. Y85Aabc enthält drei, Y85Ade zwei tRNA^{Tyr} Gene. Diese Gene mit sehr ähnlichen Introns sind jeweils vom selben Strang codiert und nur von 374 (Y85Aa-b), 393 (Y85Ab-c) bzw. 275 (Y85Ad-e) bp Spacer DNA getrennt. Die Intronsequenzen dieser Gene zeigen lediglich eine schwache Homologie zum Y22Fa Intron.
- 2) Die Intronsequenzen der beiden tRNA^{Tyr} Gene aus der Region 22F unterscheiden sich in ihrer Länge stark (21 bzw. 48 Nukleotide). Sie weisen nur sehr schwache Sequenzhomologien in ihrer 3' Region auf. Diese beiden Gene sind 2,4 kb voneinander getrennt und vom komplementären DNA Strang codiert.
- 3) Das tRNA^{Tyr} Gen mit dem 113 Nukleotide langen Intron (Y28C) scheint als einziges nicht in der Nachbarschaft eines anderen tRNA^{Tyr} Gens zu liegen.

Diese Beobachtungen und der Befund von Gouilloud und Clarkson (1986), dass das tRNA^{TyrD} Gen nicht mit den geclusterten tRNA^{TyrC} Genen assoziiert vorliegt, könnten darauf hindeuten, dass tRNA^{Tyr} Gene bei höheren Eukaryonten generell verschiedene Intronsequenzen enthalten können und dass nur Gene mit sehr ähnlicher Intronsequenz geclustert vorliegen. Mögliche Zusammenhänge mit der stadien- und gewebe-spezifischen Aktivierung dieser Gene werden weiter unten diskutiert.

c) Expression der tRNA^{Tyr} Gene

Die ungewöhnliche Intronstruktur wirft die Frage auf, ob diese Gene überhaupt aktiv sind und funktionelle tRNA^{Tyr} produzieren oder ob es sich bei diesen um Pseudogene handelt. Die im folgenden aufgeführten Beobachtungen sprechen für aktive Gene:

- 1) Die codierende Sequenz aller Gene stimmt mit der Sequenz der reifen tRNA^{Tyr} von *Drosophila melanogaster* vollständig überein.
- 2) Die Gene Y22Fa, Y22Fb, Y28C und Y85Ab lassen sich im *Xenopus* Oocytensystem *in vivo* transkribieren und prozessieren. Sie werden dabei modifiziert wie die *Xenopus* tRNA^{Tyr} (Abb. 13a-c; im Detail im nächsten Abschnitt beschrieben).
- 3) Die Gene Y22Fa und Y22Fb werden auch *in vitro* transkribiert (U. RajBhandary, Cambridge MA, pers. Mitteilung)
- 4) Mit Nuklease S₁-Mapping konnte in *Drosophila melanogaster* Kern-Fraktionen die Vorläufer-tRNA und die RNA-Intronsequenzen der Gene Y22Fb und Y28C nachgewiesen werden (Abb. 15). Dies zeigt, dass diese Gene in *Drosophila* transkribiert und gespleisst werden.
- 5) Wird das Gen Y22Fa zu einem amber Suppressor mutagenisiert und durch P-Element Transformation wieder ins Genom von *Drosophila melanogaster* integriert, verursacht es in verschiedenen unabhängigen Linien Sterilität (R. Dörig, 1986; Laski and Rubin, 1986). Weiter scheint es sowohl eine potentielle amber Nonsense Mutation im *ry* Gen wie auch eine CAT-amber Nonsense Mutation zu supprimieren (R. Dörig, 1986; Laski and Rubin, 1986).
- 6) Alle tRNA^{Tyr} Gene enthalten in der 3' flankierenden Region Oligo(dT) Sequenzen, die als Terminationssignale für die Polymerase III wirken können (Bogenhagen and Brown, 1981; Cozzarelli et al, 1983).

d) Ψ -Modifikation und Sekundärstruktur

Johnson und Abelson (1983) zeigten, dass die Hefe ochre Suppressor tRNA^{Tyr} nur dann als Suppressor aktiv ist, wenn das tRNA Gen ein Intron trägt. Die Expression des Gens ohne Intron führt zu einer tRNA, der die Ψ -Modifikation in der Mitte des Anticodons (Position 35) fehlt. Die Ψ -Modifikation ist also für die Decodierung des ochre Terminationscodons durch die ochre Suppressor tRNA^{Tyr} von Hefe essentiell. Bei *S. cerevisiae* sind die Introns in den tRNA^{Tyr} Genen sehr ähnlich (oben zitiert). Die Introns von *Drosophila* und *Xenopus* tRNA^{Tyr} Genen zeigen kaum Sequenzhomologien zu denjenigen von Hefe und divergieren auch innerhalb der Art. Daraus ergibt sich die Frage, ob alle diese Gene mit den verschiedenen Introntypen für eine Ψ -modifizierte tRNA^{Tyr} codieren können.

Als Versuchssystem wurde die *Xenopus* Oocyte gewählt. Somit wurde in diesen Versuchen die Ψ -Synthase von *Xenopus* getestet. Es zeigte sich, dass alle verschiedenen tRNA^{Tyr} Gentypen von *Drosophila* und *Xenopus* modifizierte Transkripte liefern (Abb. 13a-c und Y. Choffat, pers. Mitteilung). Da die reife tRNA vom Modifikationsenzym nicht erkannt wird (Johnson and Abelson, 1983; Abb. 13d und weitere Versuche, nicht gezeigt) und bereits der Vorläufer mit Intron modifiziert gefunden wird (Nishikura and De Robertis, 1981; Y. Choffat, pers. Mitteilung), muss in diesen Vorläufern eine Struktur vorhanden sein, die vom Modifikationsenzym erkannt wird. Unter der Annahme, dass alle tRNA^{Tyr} Vorläufer vom gleichen Modifikationsenzym erkannt werden, muss eine strukturelle Eigenschaft diesen Vorläufern gemeinsam sein. Da keine sinnvolle Konsensussequenz gefunden werden konnte, wurde mit zwei verschiedenen Programmtypen nach einer gemeinsamen Sekundärstruktur gesucht. Eine Basenpaarung zwischen Anticodon und Intron, wie sie bei den Hefe Vorläufer-tRNAs gefunden wird (Ogden et al., 1984; Swerdlow and Guthrie, 1984; Lee and Knapp, 1985), wäre die naheliegendste Möglichkeit.

Solche Basenpaarungen zwischen Intron und Anticodon können bei den meisten Vorläufer-tRNAs gefunden werden (Abb. 14), obwohl eine solche Sekundärstruktur nicht unbedingt die energetisch günstigste ist. Die

Stamm-Loop Analysenprogramme von Queen and Korn (1980) und von R. Staden (1978) waren die Grundlage für die Sekundärstrukturmodelle in Abbildung 14a. Dieser Programmtyp hat den Vorteil, dass bei der Wahl der richtigen Parameter verschiedene mögliche Strukturen ausgearbeitet werden können. Ihr Nachteil ist, dass speziell bei längeren Sequenzen eine derartige Analyse sehr arbeitsintensiv ist, und dass die Stabilität der verschiedenen Strukturkombinationen nicht mit einem vernünftigen Aufwand errechnet werden kann.

Das eigentliche Sekundärstrukturprogramm, das Faltungsprogramm von Zucker und Stiegler (1981), kann auch lange RNA Moleküle falten. Diejenige Struktur wird ausgedruckt, die unter Berücksichtigung vieler bekannter Parameter (Tinoco et al., 1973) die energetisch günstigste Faltung aufweist. Die Vor- und Nachteile sind offensichtlich. Das Faltungsprogramm erlaubt eine extrem schnelle Verarbeitung auch relativ langer Sequenzen unter Berücksichtigung der Stabilität von vielen Strukturkombinationen. Sein Nachteil ist, dass nur die energetisch günstigste Faltung ersichtlich ist. Es könnten aber *in vivo* auch andere Strukturen vorliegen, die nach der energetischen Berechnung nur wenig ungünstiger sind. Weiter gilt es auch zu berücksichtigen, dass *in vivo* das Transkript bereits während der Synthese gefaltet wird. Dies könnte zur Folge haben, dass schon während der Synthese eine Sekundärstruktur entsteht, die zuviel Aktivierungsenergie benötigt, um in die theoretisch ermittelte, energetisch günstigste, überführt zu werden.

Mit dem Faltungsprogramm wurde von allen *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} Intronsequenzen (inkl. Anticodonloop und -stamm; ausser Y85Ab) die günstigste Struktur ermittelt. Das U in Position 35 ist hier bei Y22Fb und bei Y28C nicht gepaart (Abb. 14b). Aus den oben diskutierten Gründen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Ψ -Synthase eine Basenpaarung Intron - Anticodon erkennt. Denkbar wäre aber auch, dass eine andere Sekundärstruktur oder die Tertiärstruktur erkannt wird. Die Resultate von Strobel und Abelson (1986) zeigen, dass eine Mutation der Intronregion, die für die Basenpaarung Anticodon-Intron bei der Leucin inserierenden Suppressor tRNA SUP53 benötigt wird, zum Fehlen der Modifikation m⁵C in der Wobble Position führt. Dies deutet

ebenfalls darauf hin, dass diese Basenpaarung für die Erkennung durch das m⁵C-Modifikationsenzym notwendig ist. Andere Mutationen im Intron führen aber ebenfalls zum Fehlen dieser Modifikation. Da durch Mutagenese meist nicht nur eine Struktur verändert wird, ist keine eindeutige Interpretation dieser Resultate möglich.

Green et al. (1982) charakterisierten eine Säuger tRNA Pseudouridin Synthase, die spezifisch ist für die Ψ -Bildung in den Positionen 38, 39 und 40. Sie sind der Meinung, dass es daneben mehrere verschiedene Pseudouridin Synthasen gibt, die andere Positionen modifizieren. Sie haben Hinweise dafür, dass die charakterisierte Synthase nicht die Primärstruktur sondern höhere Strukturen erkennt.

Werden die ganzen Vorläufer-tRNAs gefaltet, so entsteht mit diesem Programm nur gerade bei Y28C und Y85Ad (Y85Ab nicht untersucht) eine neue Sekundärstruktur im Bereich der "reifen" tRNA (Abb. 14c). Swerdlow und Guthrie (1984) und Lee und Knapp (1985) untersuchten die Sekundärstruktur von Vorläufer-tRNAs ebenfalls unter Berücksichtigung der energetischen Daten von Tinoco et al. (1973). Es zeigte sich, dass die Sekundärstruktur der reifen tRNA bereits im Vorläufer enthalten ist. Dieser Befund wurde auch experimentell bestätigt. Gandini Attardi et al. (1985) haben gute Hinweise dafür, dass die Spleiss-Endonuklease die L-Struktur der Vorläufer-tRNA erkennt. Da allgemein angenommen wird, dass ein einziges Spleiss-Enzym auf alle tRNA Vorläufer wirkt (obige Zitate und Peebles et al., 1983, Sharp et al., 1985), muss daraus gefolgert werden, dass ein Vorläufer mit der Struktur von Y28C, wie sie in Abb. 14c dargestellt ist, nicht gespleisst werden kann. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass dieses Gen exprimiert wird. Es ist daher denkbar, dass die Vorläufer-tRNAs in mehreren verschiedenen Sekundärstrukturen vorliegen, die *in vivo* ineinander übergeführt werden können. Möglich wäre auch, dass die Sekundärstruktur der Vorläufer-tRNAs stabil ist und nur eine Struktur gespleisst wird. Im zweiten Fall liesse sich die Expression dieses Genes durch die Faltung des Vorläufers kontrollieren.

3. Stadienspezifische Expression der tRNA^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C

Die 5' flankierenden Sequenzen von tRNA Genen modulieren die Transkriptionsrate (Sharp et al., 1985). DeFranco et al. (1980) zeigten, dass ein *Drosophila melanogaster* tRNA^{Lys-2} Gen, das vier aufeinanderfolgende dTs (nicht codierender Strang) in den Positionen -20 bis -23 enthält, im Keimbläschen Extrakt viel besser transkribiert wird, als andere tRNA^{Lys-2} Gene, die die Oligo(dT) Sequenz in einem anderen Abstand zum Strukturgen enthalten. Im homologen *in vitro* System, in KcO Zellextrakten, wird ein tRNA^{Lys-5} Gen mit fünf aufeinander folgenden dTs in Position -20 bis -24 gut transkribiert (DeFranco et al., 1982), währenddem zwei tRNA^{Arg-2} Gene mit einer Oligo(dT) Sequenz von -14 bis -18, bzw. von -21 bis -25 schlecht transkribiert werden (Dingermann et al., 1982). Y22Fa hat vier aufeinander folgende dTs in den Positionen -20 bis -23. Beim Gen Y22Fb findet sich die nächstgelegene Oligo(dT) Box in der upstream Region in der Position -25 bis -28. Das Gen Y22Fa wird sowohl *in vivo* im *Xenopus* Oocytensystem als auch *in vitro* besser transkribiert als das Gen Y22Fb (Y. Choffat bzw. U. RajBhandary, pers. Mitteilung). Dies bestätigt die oben erwähnten Befunde.

5' flankierende Regionen, die *in vitro* modulierenden Einfluss auf die Transkriptionsrate haben, könnten *in vivo* unterschiedliche gewebe- und stadienspezifische Expression bewirken. Bisher ist nur wenig bekannt über stadien- und gewebespezifische Regulation von tRNA Genen (Sharp et al., 1985). Die Resultate von Gouilloud und Clarkson (1986) zeigen, dass die *in vitro* Transkription der *Xenopus* TyrC und TyrD Gene von der 5' flankierenden Sequenz moduliert wird. Diese beiden Gene unterscheiden sich in den flankierenden Sequenzen, im Intron und auch in der codierenden Sequenz. Das TyrC Gen ist in den Oocyten aktiv, das TyrD Gen im somatischen Gewebe (S. Clarkson, pers. Mitteilung). Bei den *Bombyx mori* tRNA Genen, die in der Seidendrüse sehr stark exprimiert werden, könnten die gewebespezifischen Regulationssequenzen ebenfalls in der 5' flankierenden Sequenz liegen (Young et al., 1986). Diese Sequenzen modulieren *in vitro* die Transkriptionsrate. Möglicherweise

beeinflusst aber auch die 3' flankierende Sequenz die Transkription dieser Gene (Wilson et al., 1985).

Unter der Annahme, dass die Abundanz der Vorläufer-tRNA die *in vivo* Expressionsrate wiedergibt, lässt sich die stadienspezifische Expression der *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} Gene Y22Fb und Y28C verfolgen. Das tRNA^{Tyr} Gen Y22Fb wird vom ersten bis zum frühen dritten Larvenstadium exprimiert (Abb. 15c). Es muss demnach stadienspezifisch reguliert sein. Das tRNA^{Tyr} Gen Y28C zeigt ein komplexeres Expressionsmuster (Abb. 15b). Auch dieses Gen ist demnach während der Entwicklung unterschiedlich reguliert. Im Unterschied zum Gen Y22Fb akkumulieren im Kern die Introns der Y28C Transkripte viel stärker (ca. $1/10$ bis $1/100$ der U₆ snRNA).

Die Zunahme der Intron-RNA fällt im ersten Larvenstadium mit der starken Expression des Vorläufers zusammen. Auch im späten dritten Larvenstadium erreicht die Vorläufer Expression ein Maximum und unmittelbar danach, im frühen Puppenstadium, ist sehr viel mehr Intron-RNA vorhanden. Somit könnte die Zunahme der Intron-RNA teilweise auf erhöhte Transkription zurückzuführen sein (siehe aber auch weiter unten).

Ein Vergleich der 5' flankierenden Sequenzen der tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* zeigt nur wenig Homologien. Eine unterschiedliche stadien- und gewebespezifische Regulation durch die 5' flankierenden Sequenzen ist daher möglich.

4. Expression benachbarter Pol II-Gene

Es konnte gezeigt werden, dass alle tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* in der Nähe von Genen lokalisiert sind, die für polyadenylierte Transkripte codieren (Abb. 16-20). Alle diese Transkripte sind auf unterschiedliche Art stadienspezifisch reguliert. Die Transkripte der Klone Y28C und Y85Aabc wurden teilweise kartiert. Beim Gen Y28C wird ein Exon des polyadenylierten Transkriptes ca. 280 bp nach dem Ende der codierenden tRNA^{Tyr} Sequenz von demselben Strang codiert. Beim Gen Y85Aabc wird das 5' Ende der poly(A)⁺-RNA ca. 440 Nukleotide vor dem Gen Y85Aa vom komplementären Strang codiert, und schliesslich

trennen die Polyadenylierungsstelle des *DPP-C* Transkriptes nur 313 Nukleotide von der codierenden Sequenz des Gens Y22Fb (Abb. 5 und Padgett et al., 1987; Abb. 20). Diese beiden RNAs werden von den komplementären Strängen codiert.

Eine Assoziation von Polymerase III- mit Polymerase II-Genen wurde auch von Sutcliffe et al. (1982) gefunden. In ihrem Modell gehen sie davon aus, dass die Transkription durch Polymerase III die Polymerase II-Gene für die Transkription zugänglich macht (Sutcliffe et al., 1984a, 1984b). Experimente in einem anderen Labor führten jedoch zu Resultaten, die zum Teil im Widerspruch zu den Ergebnissen von Sutcliffe stehen (Owens et al., 1985). Da die beiden Gruppen aber unterschiedliche Versuchsansätze wählten, sind die Aussagen dieser Experimente auch verschieden. Fasst man beide experimentellen Ansätze zusammen, lässt sich daraus ableiten, dass ID Sequenzen möglicherweise als gewebespezifische Enhancer für die Transkription von Pol II-Genen im Gehirn wirken. Diese Hypothese wird gestützt durch den Befund, dass enhancer-ähnliche Elemente des JC Virus starke Homologie zu den ID Sequenzen zeigen. Diese Enhancer bewirken eine gewebespezifische Transkription in Gliazellen (Kenney et al., 1984). Auch Minárovits et al. (1984) vermuten, dass Identifier Sequenzen, von einem Oncovirus aufgenommen, dessen maligne Transformation spezifischer Zelltypen bestimmen könnten. Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass das Identifier Element als positive *cis*-regulatorische Sequenz wirken kann. Dessen Lage und Orientierung bezüglich Promotor und Transkriptions Startpunkt beeinflusst die Effizienz der Expression zusätzlich (McKinnon et al., 1986). Zur Zeit ist jedoch nicht klar, ob die Transkription der ID Sequenz für deren Enhancer Aktivität Bedingung ist. Es ist denkbar, dass die Polymerase II-Genexpression in einigen Fällen von der Regulation von Polymerase III-Genen abhängig ist (siehe auch unten).

Die tRNA^{Tyr} Gene von *Drosophila melanogaster* sind nicht mit anderen tRNA Genen geclustert. Die Intronsequenzen der Gene, die in verschiedenen cytologischen Regionen lokalisiert sind, weisen keine Homologien auf. Eine gemeinsame Funktion dieser Introns ist aber in allen Genen erhalten. Alle Intronotypen besitzen die Information, welche

von der *Xenopus* Ψ -Synthase zur korrekten Modifikation des Anticodons erkannt werden muss. Die stark verschiedenen Introns deuten aber auf einen zusätzlichen, bisher nicht bekannten, Selektionsdruck hin. Ein solcher könnte durch Interaktion zwischen den Polymerase II und den Polymerase III-Genen entstehen. Da einige der tRNA^{Tyr} Gene in potentiellen Kontrollregionen der Polymerase II-Gene liegen (siehe unten), ist es denkbar, dass die tRNA^{Tyr} Gene, bzw. ihre Intronsequenzen, als *cis*-regulatorische Kontrollelemente für die benachbarten Polymerase II-Gene dienen. Da die Introns auch palindromische Sequenzen enthalten (Abb. 14), wäre auch eine Bindung von *trans*-wirkenden Faktoren, die Palindromsequenzen erkennen, möglich. Solche regulatorischen Palindromsequenzen wurden z.B. bei den heat shock Genen (Pelham and Bienz, 1982) und bei Hefe gefunden (R. Brent, 1985; Johnson and Herskowitz, 1985).

Obwohl bis jetzt kein kausaler Zusammenhang zwischen den tRNA^{Tyr} Genen von *Drosophila* und den benachbarten Pol II-Genen nachgewiesen wurde, sollen zum Abschluss Hypothesen vorgeschlagen werden, die als Grundlage für weitere Experimente dienen können. Sie werden an den besonders auffälligen Beispielen exemplifiziert. Dies soll nicht heissen, dass diese Regulationsmöglichkeit nicht bei allen tRNA^{Tyr} Gentypen vorkommen könnte.

Die tRNA^{Tyr} Gene Y85Aabc liegen unmittelbar vor dem Polymerase II-Gen in dessen 5' flankierender Sequenz (Abb. 20c). Mittlerweile konnten in 5' flankierenden Sequenzen vieler eukaryontischer Polymerase II-Gene ausgedehnte *cis*-regulatorische Elemente gefunden werden, welche die Transkription dieser Gene kontrollieren. Die Annahme, dass die 3 tRNA^{Tyr} Gene Teile der Kontrollelemente des Pol II-Gens darstellen könnten, liegt daher nahe. Eine schrittweise Deletionsanalyse kann darüber Auskunft geben, welche Funktionen die einzelnen tRNA Gene besitzen (Enhancer? Silencer? Vermittler von Stadien- und Gewebespezifität?). Die genetische Analyse des DPP-Komplexes unterstützt diese Ansicht. Die beiden tRNA^{Tyr} Gene Y22Fa und Y22Fb sind in der genetisch definierten Kontrollregion des *decapentaplegic* Komplexes lokalisiert (Abb. 20a; Gelbart et al., 1986 und pers. Mitteilung).

Rearrangement Bruchpunkte distal vom Gen Y22Fb (zwischen diesem und dem *DPP-C* Transkript) führen zu einem anderen Phänotyp als solche zwischen den beiden tRNA Genen. Wiederum einen anderen Phänotyp zeigen Mutationen mit einem Bruchpunkt proximal vom Gen Y22Fa (Gelbart et al. 1985). Dies zeigt die offensichtliche Bedeutung der tRNA^{Tyr} Genregion für die Kontrolle des *DPP*-Komplexes. Die Expression des *DPP-C* Gens und des Y22Fb Gens sind komplementär. Im ersten Larvenstadium ist keine *DPP-C* Transkription mehr erkennbar (Padgett et al., 1985). In diesem Stadium lässt sich zum erstenmal der Y22Fb Vorläufer nachweisen. Im zweiten Larvenstadium ist dieser tRNA^{Tyr} Vorläufer weiterhin vorhanden. Das *DPP-C* Transkript tritt erst wieder schwach im frühen dritten Larvenstadium auf, in jenem Stadium, in dem die Vorläufer-tRNA zum letztenmal nachgewiesen werden kann (Abb. 15c).

Es ist deshalb denkbar, dass ein an die Intronsequenz des tRNA Gens Y22Fb bindender Faktor für die Transkription des Polymerase II-Gens benötigt wird. Durch die Transkription des tRNA^{Tyr} Gens würde dieser dann von der DNA verdrängt, wodurch die *DPP-C* Transkription verunmöglicht würde. Eine alternative Hypothese wäre ein Silencer Element, das nur dann einen Pol II-Transkription inhibierenden Faktor binden kann, wenn der stabile Komplex zwischen dem tRNA Gen und den Polymerase III Transkriptionsfaktoren gebildet ist (Sharp et al., 1985). Silencers scheinen nach verschiedenen Prinzipien funktionieren zu können und wirken z.T. über viele kb DNA hinweg (R. Brent, 1985).

Die erstmalige Expression des polyadenylierten 28C Transkriptes im späten dritten Larvenstadium fällt mit einer verstärkten Akkumulation des Y28C Vorläufers zusammen (Abb. 15b und Abb. 17). Die grösste Menge des poly(A)⁺-Transkriptes wurde in den Puppen nachgewiesen (Abb. 17). Im frühen Puppenstadium konnte aber auch die Intron-RNA des tRNA^{Tyr} Gens Y28C verstärkt nachgewiesen werden, was auf verstärkter Transkription des Gens während des späten dritten Larvenstadiums und/oder v.a. reduzierter Degradation in der Puppe beruhen kann.

Für das 28C Gen erklärt das folgende Modell die obigen Befunde: Ein konstitutiv synthetisierter Repressor (für das untersuchte Polymerase II-Transkript) bindet an die Intronsequenz des tRNA^{Tyr} Gens. Da dieser aber auch an die RNA Sequenz binden kann, wird er bei erhöhter Transkription des tRNA^{Tyr} Gens wegtitriert, wodurch die Transkription des Polymerase II-Gens ermöglicht wird. Eine solche Bindung an die RNA Intronsequenz könnte diese vor der Degradation schützen. Dies wäre auch eine Erklärung für die extrem hohe Konzentration dieser Intronsequenz in den Kern-RNA Fraktionen. Die Regulation eines Pol II-Gens wäre dann direkt von der Expression eines Pol III-Gens abhängig. Die Regulation von Pol III-Genen ist am Beispiel der *Xenopus* 5s RNA Gene am besten untersucht worden. Der Übersichtsartikel von D. Brown (1984) fasst diese Arbeiten zusammen und offeriert ein faszinierendes, einfaches Modell zur entwicklungsbiologischen Regulation dieser Gene.

In den letzten Jahren sind wiederholt die vielseitigen Funktionen des tRNA Moleküls offensichtlich geworden (Ciechanover et al., 1985; Schön et al., 1986). Es würde uns nicht erstaunen, wenn eine ähnliche Vielfalt der Funktionen für die tRNA codierenden Gene in nächster Zukunft nachgewiesen würde.

V. L I T E R A T U R

- Altwegg, M., and Kubli, E. (1979). The nucleotide sequence of phenylalanine tRNA₂ of *Drosophila melanogaster*: Four isoacceptors with one basic sequence. Nucl. Acids Res. 7, 96-105.
- Amstutz, H., Munz, P., Heyer, W.-D., Leupold, U., and Kohli, J. (1985). Concerted evolution of tRNA Genes: Intergenic conversion among three unlinked Serine tRNA genes in *S. pombe*. Cell 40, 879-886.
- Bankier, A.T., and Barrell, B.G. (1983). Shotgun DNA sequencing. In: Techniques in Nucleic Acid Biochemistry. Elsevier/North-Holland B508, 1-34.
- Barciszewski, J., Barciszewska, M., Suter, B., and Kubli, E. (1985). Plant tRNA Suppressors: *In vivo* readthrough properties and nucleotide sequence of Yellow Lupin seeds tRNA^{Tyr}. Plant Science 40, 193-196.
- Beier, H., Barciszewska, M., Krupp, G., Mitnacht, R., and Gross, H.J. (1984a). UAG readthrough during TMV RNA translation: Isolation and sequence of two tRNAs^{Tyr} with suppressor activity from tobacco plants. EMBO J. 3, 351-356.
- Beier, H., Barciszewska, M., and Sickinger, H.D. (1984b). The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts. EMBO J. 3, 1091-1096.
- Bienz, M. (1981). Informationelle Suppression bei *Drosophila*: Entwicklung und Resultate eines 'in vivo' Testsystems, basierend auf der *Xenopus* Oocyte. Dissertation, Universität Zürich.
- Bienz, M., and Kubli, E. (1981). Wild-type tRNA^{Tyr}-G reads the TMV RNA stop codon, but Q base-modified tRNA^{Tyr}-Q does not. Nature 294, 188-190.
- Biggin, M.D., Gibson, T.J., and Hong, G.F. (1983). Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965.
- Bogenhagen, D.F., and Brown, D.D. (1981). Nucleotide sequences in *Xenopus* 5s DNA required for transcription termination. Cell 24, 262-270.
- Brent, R. (1985). Repression of transcription in yeast. Cell 42, 3-4.
- Brown, D.D. (1984). The role of stable complexes that repress and activate eukaryotic genes. Cell 37, 359-365.

- Brownlee, G.G., and Cartwright, E.M. (1977). Rapid gel sequencing of RNA by primed synthesis with reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* 114, 93-117.
- Bruce, A.G., and Uhlenbeck, O.C. (1978). Reactions of the termini of tRNA with T₄ RNA ligase. *Nucl. Acids Res.* 5, 3665-3677.
- Brunner, W. (1982). Restriktionsanalyse von zwei Transfer - RNA Gencluster bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Zürich
- Carbon, E., Haumont, E., de Henau, S., and Grosjean, H. (1983). Site directed *in vitro* replacement of nucleosides in the anticodon loop of tRNA: Application to the study of structural requirements for queuine insertase activity. *EMBO J.* 2, 1093-1097.
- Carter, P., Bedouell, H., Waye, M.M.Y., and Winter, G. (1985). Oligonucleotide site-directed mutagenesis in M13. An experimental manual. Anglian Biotechnology Limited.
- Celis J.E., and Piper, P.W. (1982). Compilation of mutant suppressor tRNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 10, r83-r91.
- Chang, D.Y., Wisely, B., Huang, S.M., and Voelker, R.A. (1986). Molecular cloning of suppressor of sable, a *Drosophila* transposon-mediated suppressor. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1520-1528.
- Choffat, Y., Suter, B., and Kubli, E. (1987). Manuskript in Vorbereitung.
- Church, G.M., and Gilbert, W. (1984). Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1995.
- Ciechanover, A., Wolin, S.L., Steitz, J.A., and Lodish, H. (1985). Transfer RNA is an essential component of the ubiquitin- and ATP dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 1341-1345.
- Cozzarelli, N.R., Gerrard, S.P., Schlissel, M., Brown, D.D., and Bogenhagen, D.F. (1983). Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5s RNA genes. *Cell* 34, 829-835.
- Dauwalder, B. (1984). Suppression bei *Drosophila melanogaster*. Charakterisierung potentieller tRNA nonsense Suppressoren. Diplomarbeit, Universität Zürich.
- DeFranco, D., Schmitt, O., and Söll, D. (1980). Two control regions for eukaryotic tRNA gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3365-3368.
- DeFranco, D., Burke, K.B., Hayashi, S., Tener, G.M., Miller, R.C.Jr., and Söll, D. (1982). Genes for tRNA^{Lys} from *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.* 10, 5799-5808.

- De Robertis, E.M., and Olson, M.V. (1979). Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes. *Nature* 278, 137-143.
- Dingermann, T., Burke, D.J., Sharp, S., Schaack, J., and Söll, D. (1982). The 5' flanking sequences of *Drosophila* tRNA^{Arg} genes control their 'in vitro' transcription in a *Drosophila* cell extract. *J. Biol. Chem.* 257, 14738-14744.
- Dörig, R. (1986). Identifikation einer amber nonsense Mutante im *rosy*-Gen von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Zürich.
- Dudler, R., Schmidt, T., Bienz, M., and Kubli, E. (1981). The genes coding for tRNA^{Tyr} of *Drosophila melanogaster* : Localization and determination of gene numbers. *Chromosoma* 84, 49-60.
- Dudler, R. and Travers, A.A. (1984). Upstream elements necessary for optimal function of the hsp 70 promotor in transformed flies. *Cell* 38, 391-398.
- Dunn, R., Addison, W.R., Gillam, I.C., and Tener, G.M. (1978). The purification of valine tRNAs of *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Biochem.* 56, 618-623.
- Ebel, J.-P., Renoud, M., Dietrich, A., Fasiolo, F., Keith, G., Favorova, O.O., Vassilenko, S., Balzinger, M., Ehrlich, R., Remy, P., Bonnet, J., and Giegé, R. (1979). In: *Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition*. P.R. Schimmel, D. Söll, and J.N. Abelson, eds. 325-343. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Filipowicz, W., and Shatkin, A.J. (1983). Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cell extract. *Cell*, 32, 547-557.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray, N. (1983). Lambda replacement Vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.
- Gandini Attardi, D., Margarit, I., and Tocchini-Valentini, G.P. (1985). Structural alterations in mutant precursors of the yeast tRNA^{Leu-3} gene which behave as defective substrates for a highly purified splicing endoribonuclease. *EMBO J.* 4, 3289-3297.
- Gelbart, W.M., Irish, V.F., St. Johnston, R.D., Hoffmann, F.M., Blackman, R.K., Segal, D., Posakony, L.M., and Grimaila, R. (1985). The *decapentaplegic* gene complex in *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 50, 119-125.
- Gelbart, W.M., Blackman, R.K., Grimaila, R., Irick, H.A., Irish, V.F., Kerkhof, L., Koehler, M.D., Padgett, R.W., Posakony, L.M., Segal, D., St. Johnston, D.R., and Taylor, M.B. (1986). Recent observations on the organization, regulation and developmental role of the *decapentaplegic* gene complex. EMBO-workshop, Kolymbari, Crete.

- Goodmann, H.M., Olson, M.V., and Hall, B.D. (1977). Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: the yeast tyrosine-inserting ochre suppressor SUP4-o. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5453-5457.
- Gouilloud, E., and Clarkson, S.G (1986). A dispersed Tyrosin tRNA gene from *Xenopus laevis* with high transcriptional activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 261, 486-494.
- Green, C.J., Kammen, H.O., and Penhoet, E.E. (1982). Purification and properties of a mammalian tRNA pseudouridine synthase. *J. Biol. Chem.* 257, 3045-3052.
- Grosjean, H., Haumont, E., Droogmans, L., Carbon, P., Fournier, M., de Henau, S., Doi, T., Keith, G., Gangloff, J., Kretz, K., and Trewyn, R. (1987). A novel approach to the biosynthesis of modified nucleosides in the anticodon loops of eukaryotic transfer RNAs. In: Phosphorus chemistry directed towards Biology. Stec, W.J., and Wiewiorowski eds. Elseviers North Holland, in press.
- Guthrie, C., and Abelson, J. (1982). Organization and Expression of tRNA genes in *Sacharomyces cerevisiae*. In: The molecular biology of yeast *Sacharomyces cerevisiae*. Metabolism and gene expression. Strathern, Jones, Broach eds. CSH 1982.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Haumont, E., Nicoghosian, K., Grosjean, H., and Cedergren, R.J. (1984). The nucleotide sequence of mannosyl-Q-containing tRNA^{Asp} from *Xenopus laevis* oocytes. *Biochimie* 66, 579-582.
- Hawthorne, D.C., and Leupold, U. (1974). Suppressors in yeast. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 64, 1-47.
- Hayashi, S., Gillam, I.C., Grigliatti, T.A., and Tener, G.M. (1982). Localization of tRNA genes of *Drosophila melanogaster* by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 86, 279-292.
- Hodgkin, J. (1985). Novel nematode amber suppressors. *Genetics* 111, 287-310.
- Igloi, G.L., and Cramer, F. (1978). Interaction of aminoacyl-tRNA synthetases and their substrates with a view to specificity. In: *Transfer RNA*, S. Altman ed. 294-349. MIT Press.
- Johnson, A.D., and Herskowitz, I. (1985). A repressor (MATa2 product) and its operator control expression of a set of cell specific genes in yeast. *Cell* 42, 237-247.
- Johnson, P.F., and Abelson, J. (1983). The yeast tRNA^{Tyr}-gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature* 302, 681-687.

- Ohashi, Z., Maeda, M., McClosky, J.A., and Nishimura, S. (1974). 3-(3-Amino-3-carboxypropyl)uridine: a novel modified nucleoside isolated from *Escherichia coli* phenylalanine transfer ribonucleic acid. *Biochem.* 13, 2620-2625.
- Okada, N., Harada, F., and Nishimura, S. (1976). Specific replacement of Q base in the anticodon of tRNA by guanine catalyzed by a cell-free extract of rabbit reticulocytes. *Nucl. Acids Res.* 3, 2593-2604.
- Owens, G.P., Chaudhari, N., and Hahn, W.E. (1985). Brain "Identifier Sequence" is not restricted to brain: Similar abundance in nuclear RNA of other organs. *Science* 229, 1263-1265.
- Padgett, R.W., St. Johnston, R.D., and Gelbart, W.M. (1987). The *decapentaplegic* gene complex of *Drosophila* encodes a protein homologous to the transforming growth factor- β gene family (Nature, in press).
- Pardue, M.L., and Gall, J.G. (1975). Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. In Prescott, D.M., *Methods in Cell Biology* 10, 1-16.
- Peattie, D.A. (1979). Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 1760-1764.
- Peattie, D.A. (1983). Direct chemical method for sequencing end-labeled ribonucleic acids. In: *Nucleic acid sequences: Analysis and interpretation.* ed. Weissman, S.M., Prager Scientific.
- Peebles, C.L., Gegenheimer, P., and Abelson, J. (1983). Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane-associated yeast endonuclease. *Cell* 32, 525-536.
- Pelham, H. (1985). Cleaning up plasmid minipreps with lithium chloride. *Trends Genet.* 1, 6.
- Pelham, H.R.B., and Bienz, M. (1982). A synthetic heat-shock promoter element confers heat-inducibility on the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *EMBO J.* 1, 1473-1477.
- Picard, P., and Schaffner, W. (1983). Correct transcription of a cloned mouse immunoglobulin gene *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 417-421.
- Queen, C.L., and Korn, L.J. (1980). Computer analysis of nucleic acids and proteins. *Methods in Enzymology* 65, 595-609.
- Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable vectors. *Science* 218, 348-353.
- Ryffel, C. (1986). *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr}: Korrelation zwischen Hefe-Diät und readthrough-Aktivität. Diplomarbeit, Universität Zürich.

- Saluz, H.P. (1984). Charakterisierung von vier "small nuclear" RNA's von *Drosophila melanogaster*, Lokalisation und Anzahl der Gene. Dissertation, Universität Zürich.
- Saluz, H.P., and Jost, J.-P. (1986). Optimized genomic sequencing as a tool for the study of cytosine methylation in the regulatory region of the chicken vitellogenin II gene. *Gene* 42, 151-157.
- Saluz, H.P., Schmidt, T., Dudler, R., Altwegg, M., Stumm-Zollinger, E., Kubli, E., and Chen, P.S. (1983). The genes coding for 4 snRNAs of *Drosophila melanogaster*: localization and determination of gene numbers. *Nucl. Acids Res.* 11, 77-90.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Schimmel, P.R. (1979). Similarities in the structural organization of complexes of tRNAs with aminoacyl-tRNA synthetases and the mechanism of recognition. In: *Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition*. P.R. Schimmel, D. Söll, and J.N. Abelson, eds. 297-310. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schimmel, P.R., and Söll, D. (1979). Aminoacyl-tRNA synthetases. General features and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 601-648.
- Schmidt, T. (1980). Lokalisation von Transfer RNA Genen durch "in situ" Hybridisierung bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich.
- Schön, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, G.C., and Söll, D. (1986). The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* 322, 281-284.
- Sharp, S., Cooley, L., Schaak, J., Burke, D.J., and Söll, D. (1985). Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes. *Crit. Rev. Biochem.* 19, 107-114.
- Silberklang, M., Gillum, A.M., and RajBhandary, U.L. (1979). Use of *in vitro* ³²P labeling in the sequence analysis of nonradioactive tRNA's. In: *Methods in Enzymology*, Moldave, K., and Grossman, eds. LIX part G, 58-109.
- Simsek, M., Petrisant, G., and RajBhandary, U.L. (1973). Replacement of the sequence G-T-Ψ-C-G(A)- by G-A-U-C-G- in initiator transfer RNA of Rabbit-Liver cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2600-2604.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

- Spencer, F.A., Hoffmann, M.F., and Gelbart, W.M. (1982). *Decapentaplegic*: A gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. Cell 28, 451-461.
- Spradling, A.C., and Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. Science 218, 341-347.
- Sprague, K.U., Hagenbüchle, O., and Zuniga, M.C. (1977). The nucleotide sequence of two silk gland alanine tRNAs: Implications for fibroin synthesis and for initiator tRNA structure. Cell 11, 561-570.
- Sprinzi, M., Moll, J., Meissner, F., and Hartmann, T. (1985a). Compilation of tRNA Sequences. Nucl. Acids Res. 13, r1-r49.
- Staden, R. (1978). Further procedures for sequence analysis by computer. Nucl. Acids Res. 5, 1013-1015.
- Stanley, J., and Vassilenko, S. (1978). A different approach to RNA sequencing. Nature 274, 87-89.
- Strobel, M.C., and Abelson, J. (1986). Effect of intron mutations on processing and function of *Saccharomyces cerevisiae* SUP53 tRNA *in vitro* and *in vivo*. Mol. Cell. Biol. 6, 2663-2673.
- Sutcliffe, J.G., Milner, R.J., Bloom, F.E., and Lerner, R.A. (1982). Common 82-nucleotide sequence unique to brain RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 4942-4946.
- Sutcliffe, J.G., Millner, R.J., Gottesfeld, J.M., and Lerner, R. A. (1984a). Identifier sequences are transcribed specifically in brain. Nature 308, 237-241.
- Sutcliffe, J.G., Millner, R.J., Gottesfeld, J.M., and Reynolds, W. (1984b). Control of neuronal gene expression. Science 225, 1308-1315.
- Suter, B. (1982). Molekulare Mechanismen der Suppression bei *Drosophila melanogaster*: Charakterisierung von tRNA^{Tyr} der Suppressormutante *su(s)²*. Diplomarbeit, Universität Zürich.
- Suter, B., Altwegg, M., Choffat, Y., and Kubli E. (1986). The nucleotide sequence of two homogeneous *Drosophila melanogaster* tRNA^{Tyr} isoacceptors: Application of a rapid tRNA anticodon sequencing method using S-1 nuclease. Arch. Biochem. and Biophys. 247, 233-237.
- Swerdlow, H., and Guthrie, C. (1984). Structure of intron- containing tRNA precursors: Analysis of solution conformation using chemical and enzymatic probes. J. Biol. Chem. 259, 5197-5207.
- Tinoco, I., Jr., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., and Gralla, J. (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature New Biol. 246, 40-41.

- Treisman, R., Proudfoot, J., Shander, M., and Maniatis, T. (1982). A single-base change at a splice site in a β -thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell* 29, 903-911.
- Vande Woude, G.F., Oskarsson, M., Enquist, L.W., Nomura, S., Sullivan, M., and Fischinger, P.J. (1979). Cloning of integrated Moloney sarcoma proviral DNA sequences in bacteriophage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4464-4468.
- Wilkins, A.S. (1986). Genetic analysis of animal development. John Wiley & Sons, Inc.
- Wilson, E.T., Larson, D., Young, L.S., and Sprague, K.U. (1985). A large region controls tRNA gene transcription. *J. Mol. Biol.* 183, 153-163.
- Wintermeyer, W., and Zachau, H.G. (1970). A specific chemical chain scission of tRNA at 7-methylguanosine. *FEBS Letters* 11, 160-164.
- Wittig, B., and Wittig, S. (1978). Purification of class A, B, and C DNA-dependent RNA polymerases from chicken embryos. *Biochim. Biophys. Acta* 520, 598-611.
- Woo, S.L.C. (1979). A sensitive and rapid method for recombinant phage screening. In: *Methods in Enzymology*, 68, 389-395; R. Wu ed.
- Wosnick, M. A., and White, B. N. (1979). The purification of Q-containing tRNAs by periodate modification. Purification and nucleoside composition of two related *Drosophila* tyrosine tRNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 561, 194-205.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Young, L.S., Takahashi, N., and Sprague, K.U. (1986). Upstream sequences confer distinctive transcriptional properties on genes encoding silk gland-specific tRNA^{Ala}. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 374-378.
- Zoller, M.J., and Smith, M. (1984). Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single stranded DNA template. *DNA* 3, 479-488.
- Zucker, M., and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucl. Acids Res.* 9, 133-148.

CURRICULUM VITAE

Beat Suter, von Winterthur (Kanton Zürich) und Unterehrendingen (Kanton Aargau), geboren am 20. 2. 1958 in Winterthur. Ich besuchte das Gymnasium und schloss 1977 mit der Matura, Typus B ab. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich, studierte Biologie und erwarb 1982 das Diplom mit Hauptfach Zoologie, Nebenfach Molekularbiologie. Seit Herbst 1982 arbeite ich als Assistent unter der Leitung von Prof. E. Kubli an meiner Doktorarbeit.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Dozenten: Bächli, Bachofen, Batschelet, Baumann, Biegert, Bienz, Billeter, Birnstiel, Briegel, Brun, Burla, Chen, Christen, Cook, Dübendorfer, Endress, Etter, Eugster, Fischer, Günter, Hohl, Hoyningen, Huber, Humbel, Jungen, Kägi, Keller, Kubli, Kummer, Nöthiger, Oswald, Parish, Rast, Rieber, Rüedi, Schaffner, Steiner, Tacier, Tardent, Wagnière, Wanner, Weber, Wehner, Weissmann, Wilson, Ziswiler.

Zum Schluss dieser Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während dieser Zeit in irgendeiner Form unterstützt haben. SKMB und EMBO boten mir die Möglichkeit, sehr effizient M-13 Sequenzier- und gezielte Mutagenese-Techniken zu lernen. Ich danke O. Hagenbüchle, R. Cortese und G. Winter sowie ihren Gruppen für die hervorragende Organisation und Durchführung dieser Kurse sowie für das erhaltene Material.

Für weiteres Material danke ich H. Amrein, M. Bienz, M. Billeter, P. Böhlen, M. Gait, W. Gelbart, M. Hoffmann und V. Pirrotta.

Die zahlreichen Diskussionen mit R. Behra, M. Bienz, M. Billeter, Y. Choffat, B. Dauwalder, R. Dörig, R. Dudler, U. Ernst, C. Gianom, R. Graf, G. Guex, E. Kubli, A. Maurer, H.-P. Saluz, T. Schmidt und D. Söll führten zu wertvollen Anregungen und wirkten sich stimulierend auf meine Arbeit aus.

R. Dörig, P. Beerli, G. Guex, R. Jaussi, H.-P. Saluz und D. Schümperli möchte ich für die Hilfe bei Textverarbeitung bzw. Computerverarbeitung von Sequenzdaten danken. Y. Choffat für die Transkriptionsstudien und ganz speziell für seine enorme Unterstützung bei der tRNA Sequenzanalyse.

P.S. Chen und E. Kubli verstanden es, die finanziellen Mittel bereitzustellen, die zum Gelingen dieser Arbeit notwendig waren. Für ihr Vertrauen möchte ich ihnen hiermit danken.

E. Kubli danke ich auch ganz speziell für die Leitung meiner Arbeit. Er räumte mir enorm viel Freiheit ein und blieb trotzdem kritisch und interessiert. Damit und auch durch seine fortwährende Unterstützung hat er mich stark gefördert.

Ganz herzlich danke ich auch meinen Eltern, Geschwister, Freunden und Freundinnen sowie all jenen, die sich für die Erhaltung der Natur einsetzen. Durch sie erhielt ich die notwendige private Unterstützung und Geborgenheit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

